

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΜΕ ΤΙΤΛΟ:
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ
ΠΟΙΟΤΗΤΑ-ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»

**«Αποτύπωση μικροβιολογικού προφίλ ονογάλακτος και
διερεύνηση της δυνατότητας αξιοποίησής του ως βιολειτουργικό
τρόφιμο»**

Ξένη Αρσενίου Αποστολακοπούλου
Τεχνολόγος Γεωπόνος- Ζωικής Παραγωγής
ΑΤΕΙ Λάρισας

2016

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΜΕ ΤΙΤΛΟ:
«ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ
ΠΟΙΟΤΗΤΑ-ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ»

**«Αποτύπωση μικροβιολογικού προφίλ ονογάλακτος και
διερεύνηση της δυνατότητας αξιοποίησής του ως βιολειτουργικό
τρόφιμο»**

Ξένη Αρσενίου Αποστολακοπούλου
Τεχνολόγος Γεωπόνος- Ζωικής Παραγωγής
ΑΤΕΙ Λάρισας

2016

Η Τριμελής Επιτροπή:

1.) Επιβλέπων Καθηγητής: κ. Α. Γκόβαρης

Καθηγητής Κτηνιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

2.) Δρ. Ε. Μαλισσιόβα, Καθηγήτρια Εφαρμογών

Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων ΤΕΙ Θεσσαλίας

3.) κ. Σ. Πουρνάρας, Καθηγητής

Ιατρικής Πανεπιστημίου Αθηνών

Αφιερώνεται,

Στους γονείς μου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία χρόνια, το ονόγαλα αποτελεί αντικείμενο μελέτης ερευνών όσον αφορά τα ευεργετικά συστατικά του και τη δυνατότητα επεξεργασίας του έχοντας ως σκοπό τη διατροφή και την υγεία του ανθρώπου, λόγω των ευεργετικών επιδράσεων που παρουσιάζει. Βάσει μελετών το ονόγαλα προσομοιάζει με το μητρικό γάλα. Δεδομένου του αυξημένου ενδιαφέροντος για παραγωγή και κατανάλωση ονογάλακτος στην Ελλάδα, πραγματοποιήθηκε η παρούσα μελέτη που σκοπός της ήταν η αποτύπωση του μικροβιολογικού προφίλ ονογάλακτος με κλασσικές τεχνικές και επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων με τη σύγχρονη τεχνική Maldi- Tof καθώς και η διερεύνηση αξιοποίησής του ως βιολειτουργικό τρόφιμο, βάσει του προφίλ των οξυγαλακτικών που περιέχει.

Για τη διεξαγωγή του πειράματος, συλλέχθηκαν 14 δείγματα γάλακτος από όνους διαφόρων περιοχών στην Ελλάδα.

Πραγματοποιήθηκαν μικροβιολογικές αναλύσεις (Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, Εντεροβακτηριακά, *Escherichia coli*, Σταφυλόκοκκους, Οξυγαλακτικά). Τα στελέχη που απομονώθηκαν ταυτοποιήθηκαν με τη μέθοδο Maldi-Tof.

Τα αποτελέσματα έδειξαν χαμηλό μικροβιακό πληθυσμό, ενώ το προφίλ των οξυγαλακτικών έδειξε μια καλή παραλλακτικότητα. Τα οξυγαλακτικά που απομονώθηκαν επιδεικνύουν ενδιαφέρουσες τεχνολογικές και πιθανώς βιολειτουργικές ιδιότητες που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν από τη βιομηχανία στους τομείς της μικροβιολογίας τροφίμων (ως προβιοτικά) και της τεχνολογίας γάλακτος (ως νέα ζυμούμενα προϊόντα).

Λέξεις κλειδιά : γάλα γαϊδούρας, μικροβιολογία ονογάλακτος, οξυγαλακτικά

Assessment of the microbial profile of donkey's milk and investigation of possibility of exploitation as a biofunctional food.

Apostolakoulou Xeni

Abstract

Donkey milk has become recently a field of scientific researches in relation to the chemical and microbiological profile and further processing possibilities in order to determine the ability to use it in nutrition due to the positive effects that it seems to have on human's health. The evidence in literature suggests that donkey milk is similar to the breast milk. In Greece there is enhanced interest for consumers for donkey milk and for milk production. Aim of that study was the assessment of the microbial profile of donkey's milk with classical microbiological techniques and confirm it by Maldi-Tof technique. As we know donkey's milk profile constitutes from lactic acid bacteria. For that reason we improved the investigation of possibility of exploitation as a biofunctional food.

A total of 14 donkey's milk samples from Greek farms were collected. A total of fourteen samples were analyzed for (Total Plate Count, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, Lactic Acid Bacteria). The strains were isolated and identified by Maldi-Tof technique.

Microbiological analysis showed very low microbial count. The profile of Lactic Acid Bacteria showed a good variability. The Lactic Acid Bacteria which isolates exhibit technological and probably biofunctional properties, that could be exploited by the industry in the sectors of food microbiology (as probiotics) and in technology of milk (as new fermented products).

Key words: donkey's milk, microbiology of donkey's milk, Lactic Acid Bacteria

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	Εισαγωγή.....	Σελ 2
2.	Θεωρητικό μέρος.....	Σελ.2
2.1.	Ονόγαλα.....	Σελ.5
2.1.1.	Εκτροφή όνων.....	Σελ.7
2.1.2.	Χαρακτηριστικά ονογάλακτος.....	Σελ.7
2.1.2.1	Χημικό προφίλ.....	Σελ.9
2.1.2.2	Μικροβιολογικό προφίλ.....	Σελ.12
2.1.3	Νομοθεσία.....	Σελ.12
2.1.4	Αξιοποίηση ονογάλακτος.....	Σελ.13
2.1.5	Επιδράσεις στην υγεία.....	Σελ.16
2.2	Βιολειτουργικές ιδιότητες.....	Σελ.16
2.2.1	Χημικές ουσίες με βιολειτουργικές ιδιότητες.....	Σελ.23
2.2.2	Μικροοργανισμοί με βιολειτουργικές ιδιότητες.....	Σελ.23
2.2.2.1	Οξυγαλακτικά	Σελ.29
3	Μεθοδολογία	Σελ.31
3.1	Δειγματοληψία	Σελ.31
3.2	Υλικά – Μέθοδοι.....	Σελ.31
3.2.1	Αποτύπωση μικροβιολογικού προφίλ ονογάλακτος με κλασσικές τεχνικές.....	Σελ.32
3.2.1.1	Προσδιορισμός Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας.....	Σελ.32
3.2.1.2	Προσδιορισμός <i>Enterobacteriaceae</i>	Σελ.33
3.2.1.3	Προσδιορισμός σταφυλοκόκκων θετικών στη πηκτάση.....	Σελ.34
3.2.1.4	Προσδιορισμός <i>Escherchia coli</i>	Σελ.34
3.2.1.5	Προσδιορισμός οξυγαλακτικών.....	Σελ.35
3.2.2	Επιβεβαιωτικές δοκιμές.....	Σελ.36
3.2.2.1	Επιβεβαιωτικές δοκιμές για σταφυλόκοκκο θετικό στη πηκτάση.....	Σελ.36
3.2.2.2	Επιβεβαιωτικές δοκιμές για εντεροβακτηριακά.....	Σελ.37
3.2.2.3	MALDI – TOF.....	Σελ.38
3.3	Στατιστική επεξεργασία.....	Σελ.38
4	Αποτελέσματα.....	Σελ.39
4.1	Περιγραφή δείγματος.....	Σελ.40
4.2	Γενικό μικροβιολογικό προφίλ ονογάλακτος στην Ελλάδα.....	Σελ.41
4.3	Μικροβιολογικό προφίλ ανά δείγμα με κλασσικές τεχνικές μικροβιολογίας.....	Σελ.49
4.4	Επιβεβαιωτικά αποτελέσματα.....	Σελ.51
4.5	Οξυγαλακτικά.....	Σελ.52
5	Συζήτηση – συμπεράσματα.....	Σελ.54

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Επιδημιολογίας της Ιατρικής Σχολής στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Με την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους βοήθησαν στην υλοποίησή της.

Τον ,κ. Α. Γκόβαρη, Καθηγητή Κτηνιατρικής Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για τη συμβολή του στην ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Ευχαριστώ θερμά, τη κ. Δρ. Μαλισσιόβα Ελένη, Καθηγήτρια Εφαρμογών Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων ΤΕΙ Θεσσαλίας, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε με την ανάθεση του θέματος και τη συμβολή της στη διεξαγωγή της μεταπτυχιακής μου μελέτης.. Για την υπομονή και τη σωστή καθοδήγησή της ώστε να διεκπεραιώσω με το καλύτερο δυνατό τρόπο τη μελέτη μου.

Τον κ. Σ. Πουρνάρα, Καθηγητή Πανεπιστημίου Ιατρικής Αθηνών για τη συμβολή του στην ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τη κ. Κατσιαφλάκα Άννα και τη κ. Κυρίτση Μαρία για τη βοήθεια τους και τη καθοδήγησή τους στις εργαστηριακές αναλύσεις, καθώς και το υπόλοιπο προσωπικό στο εργαστήριο Επιδημιολογίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ,

Τους ονοτρόφους για την άμεση ανταπόκρισή τους και τη προσφορά δειγμάτων γάλακτος για τη διεξαγωγή του πειράματός μου.

Τους γονείς μου για την ουσιαστική συμβολή τους στη παρακολούθησή μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα.

Κατάσταση πινάκων

Πίνακας	4.1.....	Σελ.40
Πίνακας	4.2.....	Σελ.41
Πίνακας	4.3.....	Σελ.42
Πίνακας	4.4.....	Σελ.43
Πίνακας	4.5.....	Σελ.43
Πίνακας	4.6.....	Σελ.44
Πίνακας	4.7.....	Σελ.44
Πίνακας	4.8.....	Σελ.45
Πίνακας	4.9.....	Σελ.45
Πίνακας	4.10.....	Σελ.46
Πίνακας	4.11.....	Σελ.46
Πίνακας	4.12.....	Σελ.47
Πίνακας	4.13.....	Σελ.47
Πίνακας	4.14.....	Σελ.48
Πίνακας	4.15.....	Σελ.48
Πίνακας	4.16.....	Σελ.49
Πίνακας	4.17.....	Σελ.50
Πίνακας	4.18.....	Σελ.51
Πίνακας	4.19.....	Σελ.52

Κατάσταση διαγραμμάτων

Διάγραμμα	4.1.1.....	Σελ.41
Διάγραμμα	4.1.2.....	Σελ.42
Διάγραμμα	4.1.3.....	Σελ.43
Διάγραμμα	4.1.4.....	Σελ.43
Διάγραμμα	4.1.5.....	Σελ.44
Διάγραμμα	4.1.6.....	Σελ.44
Διάγραμμα	4.1.7.....	Σελ.45
Διάγραμμα	4.1.8.....	Σελ.45
Διάγραμμα	4.1.9.....	Σελ.46
Διάγραμμα	4.1.10.....	Σελ.46
Διάγραμμα	4.1.11.....	Σελ.47
Διάγραμμα	4.1.12.....	Σελ.47
Διάγραμμα	4.1.13.....	Σελ.48
Διάγραμμα	4.1.14.....	Σελ.48
Διάγραμμα	4.1.15.....	Σελ.49

Εικόνα 1.....	Σελ.28
Εικόνα 2.....	Σελ.29
Εικόνα 3.....	Σελ.35
Εικόνα 4.....	Σελ.37
Εικόνα 5.....	Σελ.39

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το ονόγαλα παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον όσον αφορά τις θεραπευτικές ιδιότητες που έχει, τόσο για την υγεία των παιδιών όσο και για την πρόληψη πολλών ασθενειών στους ανθρώπους. Στην Ιταλία ύστερα από μελέτες, το ονόγαλα θεωρείται το καλύτερο φυσικό υποκατάστατο του μητρικού γάλακτος. Παρουσιάζει αντιμικροβιακές ιδιότητες λόγω της σύστασής του και της περιεκτικότητάς του σε λυσοζύμη, καθώς επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως διαιτητικό τρόφιμο για ανθρώπινη κατανάλωση (Salimei et al., 2004). Όσον αφορά τη σύστασή του σε λιπίδια παρουσιάζει υψηλά επίπεδα σε λινολενικό και λινολεϊκό οξύ και σε πρωτεΐνες εμφανίζει χαμηλή περιεκτικότητα σε καζεΐνες, ποσοστά που είναι πολύ κοντά στο ανθρώπινο γάλα.(Polidori et al., 2009). Τα γάλατα από μη παραδοσιακά είδη ζώων, όπως το ονόγαλα, αρχίζουν να κερδίζουν έδαφος για το λόγο κυρίως ότι θεωρούνται κατάλληλα να καλύψουν τις ανάγκες των ειδικών ομάδων του πληθυσμού(βρέφη, ηλικιωμένους). Το ονόγαλα σε σύγκριση με το γάλα των μηρυκαστικών έχει μελετηθεί λιγότερο, αλλά τα τελευταία χρόνια το ερευνητικό ενδιαφέρον για επένδυση κεφαλαίου στο ονόγαλα έχει αυξηθεί λόγω της παρόμοιας σύνθεσής του με το ανθρώπινο μητρικό γάλα (Polidori and Vincenzetti, 2012). Η έρευνα για το γάλα της όνου, τα τελευταία χρόνια όλο και αυξάνεται και η παρούσα μελέτη θα εστιάσει στις λειτουργικές ιδιότητες (αντιμικροβιακή δράση, ανοσοτροποποίηση, υποαλλεργικότητα) τονίζοντας ιδιαίτερα τις επιπτώσεις τους στην ανθρώπινη υγεία. Αντικείμενο μελέτης του ονογάλακτος είναι η μικροβιολογική και χημική ασφάλεια, το θρεπτικό του προφίλ και η τεχνολογία ονογάλακτος.(Aspri, Economidou et al., 2016). Το γάλα της όνου θα μπορούσε να αξιοποιηθεί ως ένα καλό συστατικό βάσης για τα προβιοτικά και τα θεραπευτικά παρασκευάσματα διατροφής. Τα αποτελέσματα πολλών μελετών είναι ιδιαίτερα ελπιδοφόρα και τονίζουν το σημαντικό λειτουργικό ρόλο που μπορούν να έχουν στη βιομηχανία τροφίμων τα οξυγαλακτικά, ως καλλιέργειες εκκίνησης, για τη βελτίωση της ποιότητας και της ασφάλειας των τροφίμων. Τα οξυγαλακτικά έχουν τεράστια οφέλη για το περιβάλλον και την υγεία. Χρειάζεται να γίνει εκτενής έρευνα για την ανακάλυψη του μυστικού των βακτηρίων (Khalisanni, 2011).

Σκοπός της εργασίας ήταν η αποτύπωση του μικροβιολογικού προφίλ (Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, Εντεροβακτηριακά, Σταφυλόκοκκους, *Escherichia Coli*, και οξυγαλακτικά) του ονογάλακτος με κλασσικές τεχνικές και επιβεβαίωση με τη σύγχρονη τεχνική Maldi- Tof. Επιπλέον, σκοπός ήταν να αξιολογηθεί η πιθανότητα αξιοποίησης του ονογάλακτος ως βιολειτουργικό τρόφιμο βάσει των οξυγαλακτικών που ανευρίσκονται στο ονόγαλα. Δίνεται ιδιαίτερη έμφαση στην αποτύπωση του μικροβιολογικού του προφίλ, το οποίο χαρακτηρίζεται χαμηλό σε σχέση με άλλα είδη γάλακτος καθώς και στο προφίλ των οξυγαλακτικών τα οποία το καθιστούν ως βιολειτουργικό τρόφιμο. Σε σύγκριση αυτών των αποτελεσμάτων, με αποτελέσματα διαφόρων βιβλιογραφικών πηγών και ερευνών, τα οξυγαλακτικά στο ονόγαλα μπορούν να αξιοποιηθούν κατάλληλα, προκειμένου να επιτευχθεί ο στόχος της παρούσας εργασίας και οι προοπτικές αξιοποίησης του ονογάλακτος ως βιολειτουργικό τρόφιμο (Salimei et al., 2004). Η παρούσα Διπλωματική Εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία & Περιβαλλοντική Υγιεινή Ποιότητα- Ασφάλεια Τροφίμων & Υδάτων & Δημόσια Υγεία» του Τμήματος Ιατρικής, της Σχολής Επιστημών Υγείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1.ΟΝΟΓΑΛΑ

Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί ιδιαίτερο ενδιαφέρον για πολλά τρόφιμα τα οποία έχουν διαιτητικές και θεραπευτικές ιδιότητες. Μεταξύ αυτών των τροφίμων, είναι και το ονόγαλα, το οποίο προσομοιάζει το ανθρώπινο μητρικό γάλα και ενδεχομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί για βρέφη που πάσχουν από αλλεργίες ή δυσανεξίες σε τρόφιμα (Salimei et al., 2011; Iacono et al., 1992). Οι θεραπευτικές ιδιότητες του ονογάλακτος ήτανε γνωστές από την αρχαιότητα, ενώ στις μέρες μας, η έρευνα προσανατολίζεται προς τη θρεπτική σύσταση και τις ευεργετικές ιδιότητες που έχει στην υγεία. Το γάλα της όνου έχει σημαντικό ρόλο στην ανθρώπινη διατροφή καθώς αποτελεί μια καλή διατροφική πηγή για το νεογνό όταν δεν είναι διαθέσιμο το μητρικό. Το γάλα βοοειδών όπως έχει αποδειχθεί είναι διαφορετικό από το ανθρώπινο και το γάλα γαϊδούρας, όσον αφορά τα μακροθρεπτικά του συστατικά και ιχνοστοιχεία, όπως επίσης και τα ποσοστά απορρόφησης των βιταμινών και ανόργανων συστατικών τα οποία μπορούν να παρουσιάσουν προβλήματα στα βρέφη (Polidori et al., 2015). Έχει χαμηλή περιεκτικότητα σε λίπος , πρωτεΐνες και ανόργανα άλατα και υψηλή περιεκτικότητα σε λακτόζη σε σύγκριση με το γάλα των βοοειδών. Η χαμηλή περιεκτικότητα σε καζεΐνη, το υψηλό ποσοστό των απαραίτητων αμινοξέων, το προφίλ των πρωτεϊνών και λιπιδίων, το οποίο προσομοιάζει στο ανθρώπινο γάλα, το καθιστούν ως ένα πιθανό διαιτητικό τρόφιμο και μια εναλλακτική λύση στη βρεφική διατροφή, όταν τα βρέφη παρουσιάζουν αλλεργία στη πρωτεΐνη του αγελαδινού γάλακτος (CMPA) (Gubic et al., 2014). Σε μελέτη των Salimei et al., (2004) , προτείνεται το ονόγαλα στη παιδική διατροφή λόγω της καλύτερης γευστικότητάς του σε σύγκριση με άλλους τύπους γάλακτος, για τη παρόμοια σύνθεσή του με το ανθρώπινο γάλα και τα ορμονικά πεπτίδια τα οποία διεγείρουν τη λειτουργική αποκατάσταση του εντέρου. Εκτός από τα πεπτίδια, υπάρχουν και ουσίες με βιοδραστικές ιδιότητες, όπως τα λιπίδια. Ο ρόλος τους έγκειται στα τρόφιμα , τα οποία παρουσιάζουν αλλεργικά συμπτώματα. Οι όνοι έχουν γίνει γνωστοί από τη Ρωμαϊκή εποχή όχι μόνο για τη διατροφική αξία του γάλακτός τους αλλά και για τις ευεργετικές ιδιότητες στη περιποίηση του δέρματος. Για μεγάλο χρονικό διάστημα, αναγνωρίστηκε ως ένα κοινό φάρμακο και στα τέλη του 19^{ου} αιώνα χρησιμοποιούνταν επιτυχώς για τη σίτιση των ορφανών βρεφών στο Παρίσι (Blasi et al., 2008). Επειδή προσομοιάζει στο ανθρώπινο γάλα, φέρεται να έχει θεραπευτικές

ιδιότητες και γι' αυτό γίνεται ολοένα και πιο σημαντικό στη Δυτική Ευρώπη κυρίως στη Γαλλία, την Ιταλία και την Ουγγαρία. Το γάλα των ιπποειδών (koumiss, ζυμώμενα γαλακτοκομικά προϊόντα) χρησιμοποιείται συχνά για θεραπείες όπως αναιμία, νεφρίτιδα, διάρροια, γαστρίτιδα, καρδιαγγειακή νόσο και για τη διέγερση του ανοσοποιητικού συστήματος. Στη Μογγολία, το koumiss θεωρείται «εθνικό ποτό» που θεραπεύει από ασθένειες. Στην Ιταλία, συνίσταται ως πιθανό υποκατάστατο του αγελαδινού για αλλεργικά παιδιά. Είναι πολύ εύπεπτο και πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά και διαθέτει μια βέλτιστη πρωτεΐνη ορού γάλακτος τη καζεΐνη, καθιστώντας το κατάλληλο υποκατάστατο του αγελαδινού στη παιδιατρική διαιτολογία. Το ονόγαλα καταναλώνεται σε χώρες όπου εκτρέφονται οι όνοι όπως στην Ασία, την Αφρική και την Ανατολική Ευρώπη και προσφάτως στη Δυτική Ευρώπη (Uniacke – Lowe, T., 2011). Όπως προείπαμε είναι ιδιαίτερα εύπεπτο και πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά. Τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά συνέβαλαν στην επιτυχία του ονογάλακτος το οποίο χρησιμοποιείται ως τρόφιμο για παιδιά, λόγω της υψηλής γευστικότητάς του καθώς και της υψηλής περιεκτικότητας σε λακτόζη. Η χημική του σύνθεση είναι παρόμοια με το ανθρώπινο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εναλλακτική λύση για βρέφη που παρουσιάζουν δυσανεξία στο αγελαδινό. Τα ένζυμα στο ονόγαλα δίνουν μερικά μοναδικά χαρακτηριστικά όπως βακτηριοκτόνες ιδιότητες οι οποίες το καθιστούν διαφορετικό από τα γάλατα άλλων θηλαστικών (Zhang et al., 2008). Θα μπορούσαμε να συνδέσουμε όλες αυτές τις ευεργετικές ιδιότητες του μαζί και με το πιο πρόσφατο ενδιαφέρον που παρουσιάζεται για την ανθρώπινη διατροφή, η οποία σχετίζεται με τα βιολειτουργικά και βιοενεργά συστατικά. Εκτός από το ρόλο που έχει στη βρεφική διατροφή, το ονόγαλα λόγω της χαμηλής λιποπεριεκτικότητας που παρουσιάζει έχει ως αποτέλεσμα χαμηλούς αθηρογόνους και θρομβογενείς δείκτες ώστε να το καθιστούν κατάλληλο για τη πρόληψη της αθηροσκλήρωσης σε ηλικιωμένα άτομα (Salimei, 2011).

Όσον αφορά τις θεραπευτικές του ιδιότητες όπως επισημαίνεται και σε έρευνα (Tesse et al., 2009) που διεξήχθη στην Ιταλία, διερεύνησαν την ανοχή και τη θρεπτική επάρκεια του ονογάλακτος σε παιδιά που παρουσίασαν αλλεργία στο αγελαδινό γάλα (Cow Milk Protein Allergy- CMPA). Η αλλεργία στο αγελαδινό γάλα (CMPA) είναι μία κοινή ασθένεια η οποία εμφανίζεται κατά τα τρία πρώτα χρόνια της ζωής των παιδιών και τα κλινικά συμπτώματα είναι ατοπική δερματίτιδα, κνίδωση /αγγειοοίδημα, γαστρεντερικά

συμπτώματα και αναπνευστικές διαταραχές(συριγμός, άσθμα). Αυτό που συνιστάται για τη θεραπεία είναι να μειωθούν/εξαλειφθούν οι πρωτεΐνες του αγελαδινού από τη διατροφή των παιδιών και έτσι το ονόγαλα θεωρήθηκε υποκατάστατο του αγελαδινού γάλακτος. Τα στοιχεία της έρευνας επιβεβαίωσαν το υψηλό ποσοστό ανοχής των παιδιών με συμπτώματα (CMPA), στο ονόγαλα. Αναφορικά με τις λειτουργικές ιδιότητες του ονογάλακτος, οι Murua A et al., (2013) απομονώσανε και ταυτοποίησαν το στέλεχος *Lactobacillus plantarum* από ονόγαλα το οποίο μπορεί να είναι χρήσιμο στο σχεδιασμό νέων λειτουργικών τροφίμων με προβιοτικές δυνατότητες. Διαθρεπτικά, σύμφωνα με μία μελέτη των F. Blasi et al (2008) το ονόγαλα παρουσιάζει αξιοσημείωτη διατροφική σημασία λόγω του χαμηλότερου ποσού των κορεσμένων λιπαρών οξέων (SFA-Saturated Fatty Acids) διότι αντιπροσωπεύει μια σημαντική πηγή των απαραίτητων λιπαρών οξέων EFA (EFA - Essential Fatty Acids), τα οποία δε συνθέτει ο οργανισμός αλλά πρέπει να τα πάρει μέσω της διατροφής και είναι απαραίτητα για την ισορροπία της ομοιόστασης του οργανισμού. Στη συγκεκριμένη μελέτη τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλα τα δείγματα γάλακτος περιείχαν υψηλό ποσοστό SFA σε σύγκριση με το ποσοστό του ονογάλακτος που ήταν χαμηλότερο.

2.1.1 ΕΚΤΡΟΦΗ ΟΝΩΝ

Ο όνος είναι ένα μέλος της οικογένειας των αλόγων το οποίο δούλεψε μαζί με τους ανθρώπους για αιώνες. Ο πιο κοινός του ρόλος ήταν για τις μεταφορές και εξακολουθεί να παραμένει ένα ζώο εργασίας στις φτωχότερες περιφέρειες (Polidori and Vincenzetti, 2012). Η εκτροφή όνων θεωρείται μια καινοτόμος κτηνοτροφική δραστηριότητα που έχει ως κύριο σκοπό τη παραγωγή κτηνοτροφικών προϊόντων (κυρίως γάλα). Η αναπαραγωγή στον όνο γίνεται με φυσική οχεία αλλά και με τεχνητή σπερματέγχυση. Η γενετήσια δραστηριότητα του όνου στην Ελλάδα ξεκινά από το Μάρτιο έως το Νοέμβριο με Δεκέμβριο και η κυοφορία έχει διάρκεια 12 μήνες. Η υπερβολική κατανάλωση τροφής οδηγεί σε παχυσαρκία με συνέπεια να παρουσιαστούν προβλήματα δυστοκίας κατά τον τοκετό. Σε αντίθεση, αύξηση της τροφής επιβάλλεται τη περίοδο από το τελευταίο τέταρτο της κυοφορίας του έως και τους τρεις μήνες μετά το τοκετό. Το σιτηρέσιο ίππων, βοοειδών, χοίρων ή πουλερικών δεν είναι κατάλληλο για τη διατροφή των όνων διότι περιέχει μεγαλύτερες ποσότητες πρωτεΐνης και ενέργειας από

όσο χρειάζονται αλλά και διάφορες προσθετικές ουσίες, οι οποίες είναι τοξικές για τα ίδια. Ο όνος είναι ένα ολιγαρκές ζώο το οποίο έχει προσαρμοστεί στο μεσογειακό κλίμα. Η φυσική του διατροφή περιλαμβάνει φυτά κάθε είδους. Στη περίπτωση όμως, που του χορηγηθεί τεχνητό σιτηρέσιο θα πρέπει να υπάρχει η σωστή αναλογία φυτικών ινών προς τη συνολική ποσότητα σιτηρεσίου. Μ' αυτό τον τρόπο προφυλάσσονται από διάφορες μεταβολικές ασθένειες. Θα πρέπει να αποφεύγεται η βόσκηση ορισμένων δηλητηριωδών φυτών και μερικά από αυτά είναι: η αλογοουρά (γένους *equisetum*), το ροδόδεντρο, κώνειο, *taxus baccata*. Ιδιαίτερη σημασία πρέπει να δίνεται και στη διατροφή του και συγκεκριμένα όσον αφορά το νερό, το οποίο πρέπει να είναι καθαρό για να το πει. Αρνείται ακόμη και αν έχουν πει από το ίδιο δοχείο άλλα ζώα (Salimei, 2011).

Θα πρέπει να χορηγείται καλής ποιότητας σανός για κατανάλωση το χειμώνα και σε περιόδους ανομβρίας. Ο σανός ψυχανθών (πλούσιος σε μηδική ή τριφύλλι), δεν ενδείκνυται στη διατροφή των όνων διότι περιέχει υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης. Σε αντίθεση ο σανός από χόρτο *phleum pretense* (φλέος), *roa*, *bromus*, ή μίγμα ψυχανθών – αγρωστωδών είναι κατάλληλος. Στη διατροφή των όνων δε χρησιμοποιούνται συμπυκνωμένες τροφές (καρποί των δημητριακών) εκτός από τις περιόδους κυοφορίας και γαλουχίας μητέρων οι οποίες βρίσκονται σε κακή σωματική κατάσταση ή σε ζώα εργασίας. Όσον αφορά τις ασθένειες, μια κατηγορία ασθενειών είναι οι μεταβολικές οι οποίες έχουν άμεση σχέση με τη διατροφή. Θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στη διατροφή με τεχνητό σιτηρέσιο, το ποσό των φυτικών ινών επί του συνολικού σιτηρεσίου. Όταν υπάρχει ασιτία ο οργανισμός προσπαθεί να καταβολίσει λίπος για να χρησιμοποιήσει ενέργεια, με αποτέλεσμα να δημιουργείται υπερλιπιδαιμία. Τα συμπτώματα των μεταβολικών ασθενειών είναι κολικοί και ισχυροί πόνοι. Η γαλακτική περίοδος διαρκεί 4-5 μήνες, αλλά η ποσότητα εμπορεύσιμου γάλακτος κατά τη διάρκεια μιας γαλακτικής περιόδου κυμαίνεται περίπου στα 30-35 kg. Είναι σταβλισμένα και υπάρχουν και τα καταλύματά τους για τη χειμερινή περίοδο. Συμπληρωματικά, κατά τη χειμερινή περίοδο που η βοσκή δυσκολεύει τα ζώα τρέφονται με επιλεγμένες ζωοτροφές οι οποίες πληρούν συγκεκριμένες προδιαγραφές. Οι όνοι χρειάζονται καθημερινή φροντίδα και γίνονται συχνοί κτηνιατρικοί έλεγχοι, οι οποίοι είναι απαραίτητοι για την υγεία των ζώων και κατ' επέκταση τη καλή ποιότητα του προϊόντος (Felix et al., 2014;

Guo et al., 2007). Στην Ελλάδα αυτό που δυσκολεύει τους εκτροφείς είναι ότι δεν υπάρχει θεσμικό πλαίσιο γύρω από το συγκεκριμένο προϊόν, με αποτέλεσμα η αγροτική πολιτική που ακολουθείται να μην ευνοεί τη προώθηση και την καθοδήγηση των παραγωγών. Στην υπόλοιπη Ευρώπη η εκτροφή των όνων είναι περισσότερο οργανωμένη και τα εκτροφεία περισσότερο εξοπλισμένα σε σχέση με τη χώρα μας. Είναι περισσότερο οργανωμένοι όσον αφορά τον εξοπλισμό των μονάδων με μηχανήματα αρμέγματος και καλύτερο σύστημα διάθεσης του ονογάλακτος. Υπάρχουν εκτροφές στην Ιταλία, Γαλλία, Γιουγκοσλαβία, Ουγγαρία, Κροατία και Ολλανδία. Εκτός Ευρώπης, η Κίνα είναι η χώρα που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη παραγωγή γάλακτος και ο πληθυσμός των ζώων πλησιάζει τα 8 εκατομμύρια. Ακολουθούν το Πακιστάν και η Αιθιοπία. Αυτό που πρέπει να προσέχουν οι παραγωγοί είναι ότι μπορούν να κυοφορήσουν μετά το τρίτο έτος. Η κυοφορία διαρκεί 372-374 ημέρες και γεννούν κυρίως ένα πουλάρι. Η γαλακτική περίοδος της γαϊδούρας διαρκεί 10 μήνες (Guo et al., 2007) .

2.1.2: ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΟΝΟΓΑΛΑΚΤΟΣ

2.1.2.1: ΧΗΜΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ

Η περιεκτικότητα του ονογάλακτος σε πρωτεΐνες, λακτόζη, λίπος και ανόργανα συστατικά το προσομοιάζει με το ανθρώπινο μητρικό γάλα. Το ονόγαλα έχει χαμηλή περιεκτικότητα των ολικών στερεών (8% - 10%) και των πρωτεϊνών (1.5% - 1.8%) , υψηλή περιεκτικότητα σε λακτόζη(6% - 7%) ενώ η περιεκτικότητα του σε λίπος κυμαίνεται από (0.28% και 1.82%) (Polidori et al.2015 ; H.Y. Guo et al., 2007). Σε έρευνα των Malissiova et al., (2015) όπου αξιολογήθηκαν τα χαρακτηριστικά του ονογάλακτος σε όνους στην Ελλάδα και στη Κύπρο οι μέσες τιμές που βρέθηκαν ήταν για το pH :7,14 το λίπος :0,52g/100mL , η πρωτεΐνη: 1,22g/mL και για την αφλατοξίνη M1 η οποία δεν ανιχνεύθηκε.

Προφίλ πρωτεϊνών

Το ονόγαλα έχει θρεπτικές και θεραπευτικές ιδιότητες για τον άνθρωπο. Όσον αφορά το προφίλ των πρωτεϊνών είναι χαμηλότερο σε σύγκριση με το αγελαδινό και με το ανθρώπινο (Malacarne et al., 2002). Η νέα αντίληψη όσον αφορά για τις λειτουργίες των πρωτεϊνών είναι ότι τα μακροστοιχεία και μικροστοιχεία (όπως οι βιταμίνες και τα μέταλλα) μπορούν ν' αλληλεπιδράσουν για την εκτέλεση διαφόρων λειτουργιών του σώματος. Όπως για παράδειγμα τα αμινοξέα και τα πεπτίδια που σχηματίζονται για τη πέψη των φυσικών πρωτεϊνών απορροφούνται και ενσωματώνονται (Αναβολισμός) σε διάφορους ιστούς και όργανα όπως οι πρωτεΐνες του σώματος. Οι πρωτεΐνες του γάλακτος συνδέουν τη διατροφή, τη διαιτολογία και τη θεραπεία. Στη πραγματικότητα το γάλα περιέχει μια ποικιλία βιοδραστικών ενώσεων με ιδιότητες οι οποίες συνδέονται με την ανάπτυξη και την επιβίωση των βρεφών, εκτός από εκείνες τις ιδιότητες που συνδέονται μόνο με τη διατροφή (Polidori et al., 2015). Περιέχει συγκεκριμένες πρωτεΐνες που βοηθούν στην αποφυγή εμφάνισης αλλεργίας καθώς και την ανάλογη συγκέντρωση πρωτεϊνών του ορού από τις καζεΐνες ώστε να είναι ιδανικό για τα παιδιά. Οι βασικότερες πρωτεΐνες ορού είναι οι: η β- λακτογλοβουλίνη (β-Lg), η α- λακταλβουμίνη (α- La), οι ανοσογλοβουλίνες (Igs), η αλβουμίνη του ορού (BSA), η λακτοφερρίνη (Lf), και η λυσοζύμη(Lyz). Η πρωτεϊνική σύνθεση του ονογάλακτος είναι διαφορετική από αυτή του αγελαδινού. Η συνολική περιεκτικότητα είναι χαμηλότερη και αρκετά παρόμοια με εκείνη του ανθρώπινου. Η περιεκτικότητα του ονογάλακτος σε πρωτεΐνες ορού γάλακτος παρουσιάζει πτώση κατά τη διάρκεια της γαλουχίας. Προσφάτως έχειδειχθεί ότι η α- λακταλβουμίνη παρουσιάζει αντιϊκές , κατά των όγκων και αγχολυτικές ιδιότητες. Στο ονόγαλα η β- λακτοσφαιρίνη είναι περίπου το 40% των πρωτεϊνών ορού γάλακτος ενώ είναι χαμηλότερη από το αγελαδινό. Αυτό μπορεί να έχει άμεση σχέση με την υποαλλεργική ιδιότητα του ονογάλακτος (Brumini et al., 2015).

Η υψηλή περιεκτικότητα της λυσοζύμης ίσως είναι υπεύθυνη για τη χαμηλή βακτηριακή συγκέντρωση του ονογάλακτος. Η λυσοζύμη είναι ένας φυσικός αντιμικροβιακός παράγοντας ο οποίος καταλύει την υδρόλυση των γλυκοσιδικών δεσμών των μυκοπολυσακχαριδών στα βακτηριακά κυτταρικά τοιχώματα. Αυτό το ένζυμο μαζί με άλλα βιοδραστικά πεπτίδια του γάλακτος συμπεριλαμβανομένου των ανοσοσφαιρινών ,

λακτοφερρίνης και λακτοϋπεροξειδάσης, μπορούν να λειτουργήσουν στο πεπτικό του βρέφους ώστε να μειωθεί η συχνότητα των γαστρεντερικών λοιμώξεων (Polidori et al., 2015). Το περιεχόμενο της λακτόζης είναι ίδιο με το ανθρώπινο και υψηλότερο από το αγελαδινό. Το ονόγαλα έχει μια σύνθεση πρωτεΐνης που είναι πλούσια σε πολυακόρεστα οξέα, απαραίτητα αμινοξέα και λακτόζη (Brumini et al., 2015).

Προφίλ λιπαρών οξέων

Τα λιπίδια γάλακτος είναι σημαντικά για τις θρεπτικές και οργανοληπτικές ιδιότητες που παρέχουν στα γαλακτομικά προϊόντα. Τα κύρια λιπίδια στο ονόγαλα είναι η φωσφατιδυλοχολίνη, η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, η φωσφατιδυλοσερίνη και η σφιγγομυελίνη. Ο υψηλός αριθμός των λιπαρών οξέων το κάνει ένα από τα πιο πολύπλοκα φυσικά λίπη. Όσον αφορά τα κορεσμένα λιπαρά οξέα, είναι η πιο αντιπροσωπευτική τάξη, η οποία σχετίζεται πιθανότατα με διαιτητικές καταστάσεις. Το ονόγαλα έχει υψηλή περιεκτικότητα στα λινελαϊκό (9,0g/100g) και λινολενικό λιπαρά (5,1g/100g) των συνολικών λιπαρών οξέων. Ωστόσο μελέτες αναφέρουν ότι η προσθήκη λινολενικού οξέος στη διατροφή βοηθά στη θεραπεία της ατοπικής δερματίτιδας (Vincenzetti et al., 2007). Τα τριγλυκερίδια αντιπροσωπεύουν το 80 - 85% των λιπιδίων στο ονόγαλα ενώ τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFAs) το 9,5% και το 5 - 10% είναι φωσφολιπίδια (Polidori et al., 2007).

2.1.2.2: ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ

Το γάλα είναι ένα καλό μέσο ανάπτυξης για πολλούς μικροοργανισμούς όπως τα βακτήρια του γαλακτικού οξέος, αφού περιέχει θρεπτικά συστατικά και το φυσικό του περιβάλλον βοηθά στην ανάπτυξη μικροβίων. Επιπροσθέτως, παρέχει μια σειρά από πρωτεϊνικούς παράγοντες οι οποίοι παίζουν σημαντικό ρόλο στην άμυνα του οργανισμού, όπως λακτοϋπεροξειδάση, λακτοφερρίνη, λυσοζύμη, ανοσοσφαιρίνες κ.ά. τα οποία έχουν την ικανότητα να θανατώνουν ή να αναστέλλουν ένα μεγάλο φάσμα παθογόνων μικροοργανισμών (Seacheol et al., 2005).

Οι μέχρι τώρα μελέτες έχουν διατυπώσει ότι το ονόγαλα έχει χαμηλό φορτίο σε παθογόνους μικροοργανισμούς (π.χ. *Escherichia Coli*, *Salmonella spp.* και *Enterobacteriaceae*) (Alberghini et al., 2013; Polidori et al., 2007 ; Ivankovic et al., 2009 ; Tidona. et al., 2010). Το γεγονός ότι το ονόγαλα έχει χαμηλό μικροβιακό φορτίο αποτελεί πλεονέκτημα όσον αφορά την ασφάλεια του και θεωρείται ότι οφείλεται στην ύπαρξη αντιμικροβιακών ουσιών, που ενδεικτικά είναι οι: *Λακτοφερρίνη(LF)*, *Λυσοζύμη(LZ)* και *συστήματα Λακτοϋπεροξειδάσης* (Seacheol et al., 2005). Το ονόγαλα διαθέτει επίσης, αμυντικούς παράγοντες οι οποίοι το προστατεύουν από μικροβιακές μολύνσεις. Αυτές οι ουσίες είναι η *Λακτοφερρίνη(LF)*, *Λυσοζύμη(LZ)*, *Λακτοϋπεροξειδάση*, οι *ανοσογλοβουλίνες* και τα *ελεύθερα λιπαρά οξέα* (Agamy et al., 1992; Polidori and Vincenzetti, 2008). Την αντιμικροβιακή του άμυνα την οφείλει στη παρουσία της *λυσοζύμης*(όπως και το ανθρώπινο γάλα) και σε μικρότερο βαθμό στη *λακτοφερρίνη* (Malacarne et al., 2002). Η αντιμικροβιακή δράση του ονογάλακτος ενδεχομένως επεκτείνεται και στα κοινά παθογόνα του γάλακτος, δεδομένου ότι σε πρόσφατη έρευνα στην Ελλάδα δεν ανιχνεύθηκαν *Escherichia Coli*, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* (Malissiova et al., 2015). Καθώς επίσης και σε έρευνα των Papademas et al., 2015 σε ονόγαλα στην Κύπρο όσον αφορά το βακτηριακό του φορτίο ήτανε πολύ χαμηλό, δηλαδή συνολικά αερόβια βακτήρια 3-4 log cfu ml⁻¹ και απουσία παθογόνων παραγόντων (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae*) και αλλοιώσεις βακτηρίων (ζύμες, μύκητες).

Έρευνα των Nazzaro Filomena et al., 2010 αναφέρει ότι εκτός της *λυσοζύμης* και την αντιμικροβιακή της δράση στο ονόγαλα, υπάρχουν και άλλα συστατικά ικανά να αναστείλουν την ανάπτυξη ορισμένων παθογόνων μικροοργανισμών. Στη συγκεκριμένη μελέτη μετά από την υδρόλυση του γάλακτος με πεψίνη, αποδείχθηκε ότι εκτός από την μεγάλη περιεκτικότητα του ονογάλακτος σε *λυσοζύμη* υπάρχουν και άλλα βιομόρια στο ονόγαλα τα οποία ενισχύουν την αντιμικροβιακή ικανότητα του ονογάλακτος.

Μελετήθηκε επίσης, η ανασταλτική δράση του ονογάλακτος, έναντι δυο βακτηριακών ειδών (*Salmonella choleraesuis*, *Shigella dysenteriae*) και ειδικά στο *S. dysenteriae* και στην ανάλυση της μικροβιολογικής χλωρίδας σε νωπό ονόγαλα και βρέθηκε ότι έχει

χαμηλό μικροβιακό περιεχόμενο. Αυτό οφείλεται κυρίως στις φυσικές αντιμικροβιακές ουσίες και κυρίως στην υψηλή συγκέντρωση λυσοζύμης (Zhang et al., (2008). Όπως έχει αποδειχθεί και σε μελέτη των Corrola et al., (2002) το χαμηλό βακτηριακό φορτίο και συγκεκριμένα (4×10^4 CFU/ml), οφείλεται στα υψηλά επίπεδα λυσοζύμης. Επίσης σε έρευνα των Chiavari et al., (2006), το νωπό ονόγαλα υπέστη ζύμωση αλλά υποβλήθηκε σε παστερίωση (63°C για 30λεπτά) ως επιπλέον μέτρο ασφαλείας. Βρέθηκε ότι περιείχε χαμηλό μικροβιακό φορτίο και συγκεκριμένα τα αποτελέσματα μετά τη θερμική επεξεργασία έδειξαν : Συνολικά αερόβια βακτήρια, *Enterobacteriaceae*, οξυγαλακτικά δεν ανιχνεύτηκαν. Όσον αφορά τα γνωστά παθογόνα στελέχη στο ονόγαλα, και συγκεκριμένα *Salmonella spp.*, *Escherichia Coli*, *Escherichia Coli* 0157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* και *Campylobacter spp* σε έρευνα που διεξήχθη ,τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά σε όλες τις φάρμες, με εξαίρεση σε ένα δείγμα από μια φάρμα το οποίο ήταν θετικό για *Bacillus cereus* (1.3×10^2 cfu/ml) (Cavallarin et al., 2014).

Το ονόγαλα θεωρείται κατάλληλο για κατανάλωση εφόσον τηρεί τα πρότυπα υγιεινής κατά τη διάρκεια του αρμέγματος όπου παρατηρείται το σύνολο των βακτηρίων να ποικίλλει από $3,7-5,9 \log \text{ cfu ml}^{-1}$ (Salimei, 2011 ; Pilla et al., 2010). Αυτό απεδείχθη σε αρκετές έρευνες όπως σε έρευνα που διεξήχθη σε φάρμες όνων στο Piedmont, στην Ιταλία, είχαν σκοπό να αναλύσουν τα χαρακτηριστικά από διάφορες φάρμες καθώς και τη χημική και μικροβιολογική ποιότητα του ονογάλακτος. Το μικροβιολογικό προφίλ διέφερε σημαντικά όταν η δειγματοληψία γινόταν με άρμεγμα στο χέρι, όπου η ολική μικροβιακή χλωρίδα ήταν πολύ χαμηλότερη απ' ότι στο γάλα που συλλέχθηκε με αυτόματο άρμεγμα (Polidori et.al., 2009), καθώς επίσης και σε έρευνα των Sarno et al., 2016 , έδειξαν ότι το γάλα της όνου θα μπορούσε να αποτελέσει ένα υγιεινό συστατικό για τη διατροφή, στο οποίο εφαρμόζονται οι κατάλληλες διαδικασίες υγιεινής και αποθήκευσης, όπου διατηρήθηκε θερμοκρασία χαμηλότερη των 3°C . Στη συγκεκριμένη μελέτη δεν ανιχνεύθηκε κανένα παθογόνο βακτήριο όπως *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για το μικροβιολογικό προφίλ του ονογάλακτος, διαδραματίζουν τα οξυγαλακτικά βακτήρια, που μπορούν να αξιοποιηθούν για την ανάπτυξη βιολειτουργικών τροφίμων. Τα οξυγαλακτικά είναι Gram θετικά βακτήρια τα οποία δε σχηματίζουν σπόρους, δε περιέχουν καταλάση, ανέχονται τη μερική πίεση οξυγόνου, ζυμώνουν σάκχαρα με το γαλακτικό οξύ σαν ένα τελικό προϊόν. Η σημαντικότητά τους στα τρόφιμα οφείλεται σε διάφορους λόγους όπως: i) τα περισσότερα τρόφιμα υποστηρίζουν την ανάπτυξη των οξυγαλακτικών βακτηρίων ii) τα περισσότερα τροφιμογενή οξυγαλακτικά βακτήρια είναι ικανά να μειώνουν το pH σε βαθμό που να μην επιτρέπει την ανάπτυξη των παθογόνων και βλαβερών βακτηρίων. Από τα οξυγαλακτικά βακτήρια που ανιχνεύθηκαν στα τρόφιμα, μόνο μερικά είδη (*Streptococcus*) είναι παθογόνα (Bozoglu et al., 1995). Μέχρι σήμερα, υπάρχει περιορισμένος αριθμός ερευνών σχετικά με την παρουσία οξυγαλακτικών στο ονόγαλα (Murua et al., 2013), όπου ανέφερε την απομόνωση και ταυτοποίηση του στελέχους *Lactobacillus plantarum* που μπορεί να είναι χρήσιμο στο σχεδιασμό νέων λειτουργικών τροφίμων με προβιοτικές δυνατότητες.

2.1.3: ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Κοινοτική Νομοθεσία (853/2004) επιτρέπει τη πώληση ονογάλακτος συμπεριλαμβάνοντας τους όνους στα «άλλα είδη γάλακτος». Σύμφωνα με την απόφαση (314/15074 – ΦΕΚ 363, 17/2/2014) η οποία απαιτεί το γάλα να προέρχεται από εκμεταλλεύσεις ιπποειδών παραγωγής γάλακτος που συμμορφώνονται με τις απαιτήσεις της ισχύουσας εθνικής και ενωσιακής νομοθεσίας για την υγεία και την ευζωία των ζώων καθώς και για την υγιεινή των τροφίμων, δηλαδή πριν τη κατανάλωση απαιτεί να γίνεται αποστείρωση. Ότι αφορά στα κριτήρια του νωπού γάλακτος ισχύουν τα οριζόμενα στο Παράρτημα ΙΙΙ, Τμήμα ΙΧ, Κεφάλαιο Ι, Παράγραφος ΙΙΙ 3 α ii) του Κανονισμού (ΕΚ) 853/2004, δηλαδή για το νωπό γάλα άλλων ειδών ισχύουν τα ακόλουθα κριτήρια: η περιεκτικότητα σε μικρόβια στους 30°C (ανά ml) $\leq 1\ 500\ 000$ (κυλιόμενος διμηνιαίος γεωμετρικός μέσος όρος, με τουλάχιστον δύο δείγματα μηνιαίως).

2.1.4 ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΟΝΟΓΑΛΑΚΤΟΣ

Η χρησιμοποίηση του ονογάλακτος λόγω των θεραπευτικών του ιδιοτήτων βρίσκει τις ρίζες της στην αρχαιότητα. Ακόμα και ο Ιπποκράτης (460 370 π.Χ) το συνιστούσε σε περιπτώσεις πυρετού και σε μολυσματικές ασθένειες, σε οίδημα για θεραπεία πληγών, σε αιμορραγία από τη μύτη και σε προβλήματα του ήπατος. Ωστόσο , αποτελέσματα διαφόρων μελετών υποδηλώνουν όπως έχουμε προαναφέρει , ότι το ονόγαλα από άποψη θρεπτικής αξίας θα μπορούσε να θεωρηθεί επαρκές για παιδιά με σύνδρομο πρωτεϊνικής αλλεργίας αγελαδινού γάλακτος (CMPA) ή άλλων αλλεργιών από τρόφιμα (Mansueto et al., 2013; Tesse et al., 2009). Το ονόγαλα λόγω όλων αυτών των ευεργετικών ιδιοτήτων που βρίσκονται στα συστατικά του, χρησιμοποιείται πλέον σε καλλυντικά, τρόφιμα (γιαούρτι , τυρί) και σε βρεφικά είδη. Παρατηρούμε λοιπόν ότι εκτός από το δυναμικό ρόλο που έχει στην ανθρώπινη διατροφή, το ονόγαλα και ιστορικά έχει χρησιμοποιηθεί στη κοσμετολογία , πιθανότατα λόγω της περιεκτικότητάς του σε λυσοζύμη η οποία είναι αποτελεσματική στη λείανση του δέρματος και στη φλεγμονή του τριχωτού της κεφαλής (Salimei et al., 2011). Επίσης στη κοσμετολογία πολλά καλλυντικά προϊόντα όπως σαπούνια , κρέμες προσώπου και σώματος περιέχουν ονόγαλα αξιοποιώντας έτσι τα ευεργετικά χαρακτηριστικά του, στα οποία χρησιμοποιείται συχνά ως βασικό συστατικό. Τα υψηλά επίπεδα φωσφολιπιδίων πρωτεΐνης το καθιστούν ως ένα πολύ καλό προϊόν κατά της αντιγήρανσης, της θεραπείας των ρυτίδων και την αναζωογόνηση του δέρματος, στην αντιμετώπιση της ακμής, του εκζέματος και της ψωρίασης.

Το ονόγαλα θα μπορούσε να αξιοποιηθεί και ως βιολειτουργικό τρόφιμο. Συγκεκριμένα θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένα καλό συστατικό βάσης για τα προβιοτικά και τα θεραπευτικά παρασκευάσματα διατροφής. Και αυτό απεδείχθη σε έρευνες που γίνανε και στις οποίες εμβολιάσανε παστεριωμένο ονόγαλα με κάποια στελέχη *Lactobacillus* και συγκεκριμένα το στέλεχος *Lb. rhamnosus* και αυτό που απέδειξαν ήτανε ότι μετά από 15 ημέρες παρέμεινε βιώσιμο (Salimei et al., 2011). Όπως και σε έρευνα των Papademas et al.,2015 απέδειξαν τη βιωσιμότητα των οξυγαλακτικών και συγκεκριμένα των στελεχών (*L.fermentum* ME-3, *L.acidophilus*) σε ζυμώμενα γάλατα όνου.

2.1.5 ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΥΓΕΙΑ

Το ονόγαλα όπως προαναφέραμε έχει και θεραπευτικές ιδιότητες που αφορούν διάφορες παθολογικές καταστάσεις. Μία από αυτές είναι και η αλλεργία που εμφανίζουν τα βρέφη στη πρωτεΐνη του γάλακτος (CMPA). Έχουν γίνει αρκετές μελέτες για το γάλα της όνου. Η πρώτη επιτυχής κλινική μελέτη με ονόγαλα, έγινε το 1992, σε 9 παιδιά με CMPA και αυτό που βρέθηκε είναι ότι παρέχει θρεπτική επάρκεια και καλή γευστικότητα (Iacono et al., 1992). Μία δεύτερη κλινική δοκιμή πραγματοποιήθηκε το 1999 σε 21 παιδιά με CMPA ή με πολλαπλές τροφικές αλλεργίες. Αυτό που αποδείχθηκε είναι ότι το γάλα της όνου αποτελεί ένα ασφαλές υποκατάστατο του αγελαδινού γάλακτος (Carroccio et al., 1999). Σε μία άλλη μελέτη που διεξήχθη το 2007 έδειξε ποσοστό ανοχής 82,6% σε επιλεγμένο πληθυσμό παιδιών με CMPA (Monti et al., 2007). Τον ίδιο χρόνο διεξήχθη και μια μελέτη σε ασθενείς με CMPA και ατοπική δερματίτιδα στην οποία το ποσοστό ανεκτικότητας στο ονόγαλα ήταν 88% καθώς επίσης βελτίωσε και το έκζεμα στα παιδιά (Vita et al., 2007). Σε μελέτη στην οποία πήραν μέρος 25 παιδιά με CMPA και στα οποία δόθηκε φρέσκο γάλα γαίδουρας έδειξε κλινική ανοχή στα 24 από τα 25 παιδιά (96%) (Tesse et al., 2009). Τέλος, σε μελέτη που διεξήχθη σε 92 παιδιά με διάγνωση CMPA, το ονόγαλα άρεσε στη γεύση και ήταν ανεκτό στα 83 παιδιά (90,2%) (Monti et al., 2012).

Από τα παραπάνω προκύπτει η σημαντικότητά του στη παιδική υγεία και διατροφή. Το ονόγαλα θεωρείται το καλύτερο υποκατάστατο του μητρικού για παιδιά με CMPA, όσον αφορά τη κλινική ανοχή, τη γευστικότητα και τη θρεπτική επάρκεια. Συγκριτικά, μεταξύ των δομικών ομοιοτήτων των πρωτεϊνών του ανθρώπινου και του ονογάλακτος θα μπορούσαμε να εξηγήσουμε τα αποτελέσματα των κλινικών μελετών τα οποία καθιστούν το ονόγαλα αξιόπιστο υποκατάστατο του αγελαδινού για τη διατροφή των παιδιών με αλλεργίες (Polidori et al., 2015). Η πιθανότητα αλλεργίας στο γάλα της όνου είναι πολύ χαμηλή αν και υπάρχουν φωσφορυλιωμένα υπολείμματα σερίνης συμβάλλει σ' αυτό όμως η χαμηλή ποσότητα καζεϊνών και συγκεκριμένα οι (αs1 και β) καζεΐνες. Λόγω λοιπόν του χαμηλού ποσοστού των καζεϊνών οι οποίες όπως αναφέραμε συντελούν στο υποαλλεργικό του προφίλ όπως επίσης και οι πρωτεΐνες που περιέχει οι οποίες δημιουργούν το θρεπτικό του προφίλ (Vincenzetti et al., 2012).

Εκτός από τις υποαλλεργικές ιδιότητες που παρουσιάζει το γάλα της όνου, παρουσιάζει αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και αντικαρκινικές ιδιότητες. Όσον αφορά την αντιμικροβιακή του δράση, χάρη στους φυσικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες που διαθέτει και συγκεκριμένα σε έναν ειδικό παράγοντα επιδερμικής ανάπτυξης (EFG), όπου στο συγκεκριμένο παράγοντα οφείλονται οι ευεργετικές επιπτώσεις στην υγεία και συγκεκριμένα του γαστρεντερικού και του βλεννογόνου. Όλα αυτά συντελούν στην ενίσχυση της άμυνας του ανοσοποιητικού των παιδιών και των ηλικιωμένων, ομάδες οι οποίες είναι οι πιο ευαίσθητες. Όπως επίσης συμβάλλουν και η λυσοζύμη, η λακτοφερρίνη και σε μικρότερο ποσοστό η λακτουπεροξειδάση και κάποιες πρωτεΐνες και ένζυμα (Brumini et al., 2015). Πολλές μελέτες αποδεικνύουν ότι επιδρά θετικά σε πολλές ασθένειες οι οποίες έχουν άμεση σχέση με το ανοσοποιητικό καθώς επίσης και στην πρόληψη της αρτηριοσκλήρυνσης (Donata et al., 2016). Αναφέρεται επίσης ότι η λακτοφερρίνη εμφανίζει πολλές βιολογικές λειτουργίες όπως αντιμικροβιακές και αντι-ιικές και επιπλέον προστατεύει από την ανάπτυξη και τη μετάσταση του καρκίνου (Silvia Vincenzetti et al., 2012). Από ανοσολογική άποψη, μπορεί να συντελέσει στη διατήρηση της ομοιόστασης του ανοσοποιητικού, λόγω των συστατικών του, τα οποία είναι ικανά να απελευθερώσουν φλεγμονώδεις και αντιφλεγμονώδεις κυτοκίνες από φυσιολογικά ανθρώπινα κύτταρα (Jirillo F. et al., 2014). Σύμφωνα με τους Jirillo F, Jirillo E et al., 2014 το ονόγαλα διαθέτει ανοσορρυθμιστικές ικανότητες και είναι ένα ισχυρό αγγειοδιασταλτικό με αντι-αθηρογόνες ιδιότητες. Έρευνα που διεξήχθη στην Ιταλία σε ηλικιωμένους ηλικίας από 72 – 97 όπου συγκρίνανε τα επίπεδα κυτοκινών του ονογάλακτος με άλλα είδη γάλακτος. Αυτό που συμπεράνανε ήτανε ότι η χορήγηση ονογάλακτος αύξησε τα επίπεδα έκκρισης συγκεκριμένων κυτοκινών (IL 6 – IL 8, ιντερλευκινών) σε σύγκριση με άλλα είδη γάλακτος. Διαπιστώθηκε λοιπόν πόσο σημαντική είναι η διατροφή στην ανάκαμψη του ανοσοποιητικού των ηλικιωμένων. Ακόμη πιο σημαντικό για την ανθρώπινη υγεία, το καθιστά η περιεκτικότητά του στα συγκεκριμένα συστατικά όπως λακτόζη, πρωτεΐνες, ιχνοστοιχεία και ω – 3 λιπαρά οξέα, τα οποία το κάνουν χρήσιμο για την διατροφή των ηλικιωμένων (Amati et al., 2010).

Όσον αφορά την αντικαρκινική του ιδιότητα και κυρίως στο καρκίνο του πνεύμονα και οι επιπτώσεις στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου στην απόπτωση και παραγωγή

κυτοκινών διαπιστώθηκε ότι συγκεκριμένες πρωτεΐνες ορού ονογάλακτος θα μπορούσαν να καταστείλουν τον πολλαπλασιασμό καρκινικών κυττάρων καθώς επίσης και να σκοτώσουν έμμεσα καρκινικά κύτταρα (μέσω της ενεργοποίησης των λεμφοκυττάρων και των μακροφάγων). Των οποίων η αντικαρκινική δραστηριότητα, μεσολαβεί μέσω του μονοξειδίου του αζώτου (NO) και των κυτοκινών, του παράγοντα νέκρωσης των κυττάρων (TNF – α), ιντερλευκίνη 6 (IL – 6) και ιντερλευκίνη 12 (IL – 12). Εκτός από τις πρωτεΐνες ορού, ένα μεγάλο ποσοστό λυσοζύμης , μπορεί να έχει αντικαρκινική δράση εκτός των άλλων ιδιοτήτων. Διαθέτει δηλαδή ιδιότητες αναστολής της αγγειογένεσης σε καρκινικά κύτταρα. Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι που διαφοροποιούνται τα νέα καρκινικά κύτταρα, οδηγώντας τα σε ωρίμανση με φυσιολογικές λειτουργίες. Ο ένας αντιδρά άμεσα με τα καρκινικά κύτταρα, ενώ ο άλλος περιλαμβάνει εκκινητές οι οποίοι δρουν στο ανοσοποιητικό σύστημα και προωθούν την έκκριση των κυτοκινών με αντικαρκινική δραστηριότητα. Όλα αυτά συντελούν στο συμπέρασμα ότι τα συστατικά του ονογάλακτος όπως οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος και η λυσοζύμη παρουσιάζουν και αντικαρκινικές ιδιότητες (Mao et al., 2009).

2.2 ΒΙΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

2.2.1 ΧΗΜΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΜΕ ΒΙΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Το χημικό προφίλ του ονογάλακτος αφορά σε πολλές ουσίες που παρουσιάζουν ενδιαφέρον ως προς τη βιολειτουργικότητά τους. Με τον όρο βιολειτουργικότητα εννοούμε το ρόλο και τη δράση κάθε χημικής ουσίας που υπάρχει σε ένα μίγμα, ως προς την απορρόφηση τους από τον οργανισμό, τη καταλυτική τους δράση σε διάφορες βιοχημικές αντιδράσεις όπου είναι απαραίτητες και τη συμμετοχή τους σε σύμπλοκες ενώσεις, έτσι ώστε να είναι σε θέση να δράσουν για συγκεκριμένες λειτουργίες στον οργανισμό. Όσον αφορά τη χημική του σύσταση οι τρεις κύριες πρωτεΐνες ορού του ονογάλακτος, είναι η α-λακταλβουμίνη, η β-λακτοσφαιρίνη και η λυσοζύμη. Υπάρχουν επίσης και άλλες ενδιαφέρουσες ουσίες όπως οι ανοσογλοβουλίνες, η λακτοφερρίνη, και οι καζεΐνες. Όσον αφορά τις ανοσοσφαιρίνες (IgG, IgM και η εκκριτική IgA) δρουν με ένα συγκεκριμένο τρόπο , που περιλαμβάνει αντιδράσεις αντιγόνου – αντισώματος. Οι υπόλοιπες τρεις λακτοφερρίνη, λακτοϋπεροξειδάση και λυσοζύμη είναι μη ειδικοί προστατευτικοί παράγοντες και οι αντιμικροβιακοί τους μηχανισμοί διαφέρουν μεταξύ

τους (Polidori et al., 2015). Έρευνες που έχουν γίνει δείχνουν ότι η α-λακταλβουμίνη έχει αντιϊκές, κατά των όγκων και αγχολυτικές ιδιότητες, καθώς επίσης και αντιφλεγμονώδη δράση που γίνεται από την αναστολή της κυκλοοξυγενάσης-2 (COX-2). Σε μελέτη των Papademas et al., (2015), διερευνήθηκε η ικανότητα των προβιοτικών *L. Fementum* ME-3 και *L. acidophilus* σε ζυμώμενο παστεριωμένο ονόγαλα όπως και οι αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και οργανοληπτικές ιδιότητες που εμφανίζουν. Η αντιμικροβιακή δράση των παραπάνω προβιοτικών οφείλεται στη δράση της λυσοζύμης. Όσον αφορά την αντιοξειδωτική τους δράση προέρχεται ύστερα από τη ζύμωση των προβιοτικών.

Πρωτεΐνες του ονογάλακτος

Η πρωτεΐνη του ονογάλακτος είναι μια ετερογενής ομάδα μορίων και κατατάσσονται σε πέντε βασικές κατηγορίες: τις καζεΐνες, πρωτεΐνες ορού γάλακτος, πρωτεΐνες γάλακτος, σφαιρίδια λίπους, ένζυμα και άλλες δευτερεύουσες πρωτεΐνες. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι υπεύθυνη για την εμφάνιση αλλεργίας των βρεφών, στις πρωτεΐνες ορού γάλακτος, στα οποία αντικαθιστούν το μητρικό γάλα με αγελαδινού τύπου γάλακτος (Malacarne et al., 2012). Η περιεκτικότητα του ονογάλακτος σε πρωτεΐνες ορού γάλακτος παρουσιάζει πτώση κατά τη διάρκεια της γαλουχίας. Η περιεκτικότητά του σε πρωτεΐνες ορού γάλακτος είναι κοντά σ' αυτή του ανθρώπινου γάλακτος, ενώ ο μέσος όρος των καζεϊνών των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος είναι μεταξύ της κατώτερης τιμής του ανθρώπινου γάλακτος και της υψηλότερης του αγελαδινού. Με αποτέλεσμα η υψηλή περιεκτικότητα του ονογάλακτος σε πρωτεΐνες ορού γάλακτος να το καθιστά ιδανικό για την ανθρώπινη διατροφή. Όσον αφορά την α-λακταλβουμίνη διαδραματίζει βασικό ρόλο στη σύνθεση της λακτόζης στον αδένα του μαστού και αποτελεί μια σημαντική πηγή αμινοξέων στο ανθρώπινο γάλα όπου αντιπροσωπεύει τη κύρια πρωτεΐνη ορού γάλακτος (Polidori et al., 2015). Οι πρωτεΐνες γάλακτος συνδέουν τη διατροφή, τη διαιτολογία και τη θεραπεία. Το γάλα περιέχει μια ποικιλία βιοδραστικών ενώσεων με ειδικές ιδιότητες, που έχουν σχέση με την ανάπτυξη και την επιβίωση των βρεφών. Οι κυριότερες αντιμικροβιακές πρωτεΐνες είναι οι ανοσοσφαιρίνες, λακτοφερρίνη, λακτοϋπεροξειδάση και λυσοζύμη (Gubic et al., 2014).

β – λακτογλοβουλίνη(β –Lg)

Είναι η βασική πρωτεΐνη γάλακτος των περισσότερων μηρυκαστικών. Συντίθεται στα εκκριτικά επιθηλιακά κύτταρα του μαστικού αδένος, υπό τον έλεγχο της προλακτίνης. Παρόλο που έχουν προταθεί αρκετοί βιολογικοί ρόλοι για τη β –Lg, όπως ενεργοποιητής της πρόσληψης βιταμίνης Α, υποκινητής της δραστηριότητας ενζύμου, δεν υπάρχουν πειστικά στοιχεία διαθέσιμα για μια συγκεκριμένη λειτουργία. Το ονόγαλα έχει δύο μορφές της β –Lg : I , II. Η μορφή I έχει 162 αμινοξέα και η II έχει 163 αμινοξέα (Uniacke – Lowe, T, 2011) Στο ονόγαλα η β-Lg είναι περίπου το 40% των πρωτεϊνών του ορού γάλακτος και αυτό έχει σχέση με το ότι το ονόγαλα έχει υποαλλεργικές ιδιότητες. Στο ονόγαλα είναι ένα μονομερές. Είναι μια πρωτεΐνη της οικογένειας λιποκαλίνης και έχει ένα ευρύ φάσμα ενώσεων ανοίγοντας έτσι το δρόμο για διάφορες υποθέσεις σχετικά με τη λειτουργία της. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη συμμετέχει σε υδρόφοβη μεταφορά πρόληψης και σύνδεσης, ρύθμιση του ενζύμου ενώ άλλοι απέδειξαν ότι τύποι β – λακτοσφαιρίνης με συμπλέγματα φολικού οξέος μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ένας αποτελεσματικός μεταφορέας φολικού οξέος σε λειτουργικά τρόφιμα (Polidori and Vincenzetti, 2012).

α- λακταλβουμίνη

Μία μοναδική πρωτεΐνη γάλακτος. Είναι μια μεταλλο -πρωτεΐνη στην οποία το ασβέστιο διαδραματίζει ένα κρίσιμο ρόλο στην αναδίπλωση και τη δομή της και έχει μια ρυθμιστική λειτουργία στη σύνθεση της λακτόζης. Περιέχει 123 αμινοξέα και εμφανίζει τρεις γενετικές παραλλαγές Α , Β, C οι οποίες διαφέρουν μόνο σε μερικές αντικαταστάσεις αμινοξέων (Uniacke – Lowe, T, 2011)

Λακτοφερρίνη

Η λακτοφερρίνη είναι μια βιοδραστική πρωτεΐνη με ιδιότητες που προωθούνε τη διατροφή και την υγεία (Uniacke-Lowe, T,2011). Είναι μια πρωτεΐνη δέσμησης σιδήρου που εμφανίζει τις εξής βιολογικές λειτουργίες: ρύθμιση της ομοιόστασης του σιδήρου, κυτταρική ανάπτυξη, αντιμικροβιακές, αντιϊκές λειτουργίες και προστασία από

την ανάπτυξη και μετάσταση του καρκίνου. Όλες οι λακτοφερρίνες που έχουν μελετηθεί είναι γλυκοζυλιωμένες. Η λακτοφερρίνη ασκεί αντιβακτηριακή δράση με δύο διαφορετικούς μηχανισμούς. Ο πρώτος οφείλεται στην υψηλή δέσμευση του σιδήρου της πρωτεΐνης που στερεί σε ορισμένα βακτήρια σιδήρου, με αποτέλεσμα να αναστέλλει την ανάπτυξή τους. Η δεύτερη αντιμικροβιακή ιδιότητα οφείλεται στο κατιονικό N – άκρο το οποίο το καθιστά υπεύθυνο για τη βακτηριοκτόνο δράση. Ελέγχει την ομαλή σύνθεση της εντερικής μικροχλωρίδας καταστέλλοντας την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων και προωθεί την ανάπτυξη των μη παθογόνων *Lactobacillus* και *Bifidobacterium* (Mariani, 2010). Η συγκέντρωση της λακτοφερρίνης στο ονόγαλα περιλαμβάνει περίπου το 4% της συνολικής πρωτεΐνης του ορού γάλακτος και είναι χαμηλή σε σχέση με το γάλα των ιπποειδών (Uniacke-Lowe, T, 2011).

Λακτοϋπεροξειδάση

Η λακτοϋπεροξειδάση είναι μια γλυκοπρωτεΐνη και ασκεί αντιμικροβιακή δράση την οποία οφείλει στη μικρή ποσότητα που βρέθηκε στο ονόγαλα. (Mariani, 2010). Είναι ένα ένζυμο που έχει δράση ενάντια στους μικροοργανισμούς που προκαλούν λοιμώξεις (Brumini et al., 2016).

Λυσοζύμη

Η υψηλή περιεκτικότητα σε λυσοζύμη που βρέθηκε στο ονόγαλα είναι υπεύθυνη για το χαμηλό αριθμό βακτηρίων και θα μπορούσε να είναι χρήσιμη για τη πρόληψη εντερολοιμώξεων σε βρέφη. Η λυσοζύμη είναι ένας φυσικός αντιμικροβιακός παράγοντας ο οποίος καταλύει την υδρόλυση των γλυκοσιδικών δεσμών των μυκοπολυσακχαριδών στα βακτηριακά κυτταρικά τοιχώματα. Αυτό το ένζυμο μαζί με άλλα βιοδραστικά πεπτίδια του γάλακτος συμπεριλαμβανομένου των ανοσοσφαιρινών, λακτοφερρίνης και λακτοϋπεροξειδάσης, μπορούν να λειτουργήσουν στο πεπτικό του βρέφους ώστε να μειωθεί η συχνότητα των γαστρεντερικών λοιμώξεων (Polidori et al., 2015). Άλλοι συγγραφείς ανέφεραν τη παρουσία δύο παραλλαγών της λυσοζύμης στο

ονόγαλα: LYS A και LYS B τα οποία διαφέρουν σε τρεις υποκαταστάσεις αμινοξέων (Polidori and Vincenzetti , 2012).

Καζεΐνες

Οι καζεΐνες είναι κατά κύριο λόγο μια πηγή αμινοξέων, ασβεστίου, φωσφόρου και βιοδραστικών πεπτιδίων για νεογνά. (Uniacke- Lowe, T, 2011) . Είναι φωσφοπρωτεΐνες και βρίσκονται στο γάλα ως μια μάζα πρωτεϊνικών κόκκων. Η βιολογική λειτουργία των καζεϊνών είναι η ικανότητά τους να σχηματίζουν μακρομοριακές δομές , μικκύλια καζεΐνης , όπου μεταφέρουν μεγάλες ποσότητες ασβεστίου στο νεογνό με ελάχιστο κίνδυνο ασβεστοποίησης του αδένα. Το ονόγαλα περιέχει περισσότερες πρωτεΐνες του ορού και λιγότερες καζεΐνες (Polidori and Vincenzetti, 2012). Τα μικύλλια βρίσκονται στο γάλα και καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο ποσοστό των καζεϊνών. Αποτελούνται από τις α , β , κ – καζεΐνες. Οι α – καζεΐνες είναι πολυφωσφορυλιωμένη μορφή (a_{s1}^- , a_{s2}^- , a_{s3}^- , a_{s4}^- , a_{s5}^- , a_{s6}^-) και από τις κύριες πρωτεΐνες στο γάλα a_{s1}^- , a_{s2}^- . Η a_{s1}^- πρωτεΐνη ερευνήθηκε στο ονόγαλα και απουσίαζε. Το ίδιο συνέβη και με την a_{s2}^- πρωτεΐνη. Η απουσία της a_{s1} πρωτεΐνης του προσδίδει το χαρακτηριστικό όσον αφορά τη βιολειτουργικότητά του και συγκεκριμένα την υποαλλεργική του ιδιότητα (Criscione et al., 2008). Η β – καζεΐνη είναι η κύρια πρωτεΐνη στο αγελαδινό αλλά δευτερεύουσα στο ανθρώπινο. Στο ονόγαλα έχει εντοπιστεί η β – καζεΐνη ,η πολυφωσφορυλιωμένη μορφή της. Η κ – καζεΐνη είναι γλυκοπρωτεΐνη και η δράση της είναι να σταθεροποιεί το μικύλλιο, ενώ η γ – καζεΐνη προέρχεται από τη πέψη των β – καζεϊνών και βρίσκεται στον αδένα.(Uniacke-Lowe, 2011,).

Βιοενεργά πεπτίδια

Τα βιοενεργά πεπτίδια είναι σημαντικά για τους φυσιολογικούς τους ρόλους , τα χαρακτηριστικά τους , καθώς και για τις ανοσοδιεγερτικές και τις αντι- υπερτασικές τους δραστηριότητες. Επίσης και για την ικανότητά τους να ενισχύσουν την απορρόφηση του ασβεστίου και να απελευθερωθούν ή να ενεργοποιηθούν κατά τη διάρκεια της γαστρεντερικής πέψης. Πολλά πεπτίδια που παράγονται από υδρόλυση των

πρωτεϊνών του γάλακτος , ρυθμίζουν τη λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος του νεογνού. Τα πεπτίδια που προέρχονται από την υδρόλυση της β- καζεΐνης των ιπποειδών έχουν θετική δράση στην ανθρώπινη υγεία. Στο ονόγαλα εντοπίστηκε ότι τα πεπτίδια έχουν προστατευτική δραστηριότητα (Uniacke-Lowe, 2011).

Λακτόζη

Η περιεκτικότητα σε λακτόζη (7%) του ονογάλακτος είναι παρόμοια με το μητρικό ανθρώπινο γάλα και υψηλότερη από το αγελαδινό. Η λακτόζη αντιπροσωπεύει ένα ιδανικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη της εντερικής χλωρίδας στους ανθρώπους και τεχνολογικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή προβιοτικών διαλυμάτων για ανθρώπινη χρήση για παράδειγμα σε φλεγμονές του εντέρου (Tafaro et al., 2007). Στην υψηλή περιεκτικότητα της λακτόζης οφείλει το ότι είναι εύγευστο και στο ότι διευκολύνει την εντερική απορρόφηση του ασβεστίου , το οποίο είναι απαραίτητο για τη μεταφορά μετάλλων στα οστά του βρέφους (Mariani , 2010). Παρουσιάζει χαμηλή περιεκτικότητα σε λίπος ενώ έχει μεγάλο αριθμό λιπαρών οξέων. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα είναι τα πιο αντιπροσωπευτικά στο ονόγαλα σε σύγκριση με τα μονοακόρεστα και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα τα οποία σχετίζονται με διατροφικές καταστάσεις. Το ονόγαλα σε μια καλά ισορροπημένη διατροφή είναι μια καλή πηγή λιπαρών οξέων. Όσον αφορά τη μοριακή του σύνθεση των πρωτεϊνών είναι σημαντική διότι επηρεάζει τις λειτουργικές ιδιότητες των πρωτεϊνών του γάλακτος όπως τη διαλυτότητα , τη πήξη , θερμική μετουσίωση και τις θρεπτικές ιδιότητες του γάλακτος. Η καζεΐνη είναι άλλη μια κύρια αλλεργιογόνα πρωτεΐνη. Το χαμηλό ποσοστό λακτοσφαιρίνης και καζεΐνης σε έρευνα των Salimei πιθανώς να έχει σχέση με τα υποαλλεργικά χαρακτηριστικά που αναφέρθηκαν στη βιβλιογραφία για τους όνους (Mariani ,2010).

Στη Μογγολία μεγάλο ποσοστό του πληθυσμού έχει δυσανεξία στη λακτόζη. Αυτό όμως δεν είναι πρόβλημα διότι μπορούν να καταναλώσουν ονόγαλα που έχει υποστεί ζύμωση αφού ένα 30% της λακτόζης μετατρέπεται σε γαλακτικό οξύ, αιθανόλη και διοξείδιο του άνθρακα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης (Uniacke-Lowe, 2011).

Λιπαρά οξέα

Το λίπος είναι σημαντικό γιατί την παροχή ενέργειας στο νεογέννητο, καθώς επίσης είναι το βασικό συστατικό που καθιστά ευδιάλυτες τις βιταμίνες και απαραίτητα λιπαρά οξέα. Τα λιπίδια γάλακτος είναι σημαντικά διότι παρέχουν ιδιότητες θεραπευτικές και οργανοληπτικές στα γαλακτοκομικά προϊόντα. Διαιτητικά είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες της σύνθεσης των λιπαρών οξέων. Τα τριγλυκερίδια (TG) αντιπροσωπεύουν το 80 – 85% των λιπιδίων στο ονόγαλα ενώ τα ελεύθερα λιπαρά οξέα (FFAs) το 9,5% και το 5 – 10% είναι τα φωσφολιπίδια (Uniacke-Lowe, 2011; Salimei et al., 2011). Στα λιπίδια υπάρχουν ουσίες με βιολειτουργικές ιδιότητες καθώς δίνεται ιδιαίτερη σημασία στη περιεκτικότητα του γάλακτος και συγκεκριμένα στα μονο-, δι-, τριγλυκερίδια, ελεύθερα λιπαρά οξέα, φωσφολιπίδια, γλυκολιπίδια και στεροειδή, καροτενοειδή, βιταμίνες και λιποπρωτεΐνες (Vincenzetti et al., 2007). Τα λιπαρά οξέα που κυκλοφορούν στο αίμα μπορεί να προέρχονται από διαιτητικό λίπος ή από λιπίδια που κινητοποιούνται από τις αποθήκες λίπους του οργανισμού. Τα κύρια λιπίδια στο γάλα του όνου είναι η φωσφατιδυλοχολίνη, η φωσφατιδυλαιθανολαμίνη, η φωσφατιδυλοσερίνη και η σφινγομυελίνη. Η συγκέντρωση των πολυακόρεστων και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων είναι μικρότερη σε σχέση με άλλα ζώα. Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα είναι υψηλότερα στο ονόγαλα από το ανθρώπινο. Όσον αφορά το στεατικό και ελαϊκό οξύ το χαρακτηριστικό τους είναι ότι έχουν χαμηλά επίπεδα στο ονόγαλα (Malacarne et al., 2002). Τα μεγαλύτερο ενδιαφέρον όταν αναφερόμαστε στη σύνθεση των λιπαρών οξέων δίνεται στα πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFAs) και ιδιαίτερα στα ω -3 και ω -6 που είναι απαραίτητα για τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού και την ανάπτυξη καθώς και για την ανάπτυξη του νευρικού συστήματος των νεογνών (Vincenzetti et al., 2007; Gastaldi et al., 2010). Περιέχει ένα υψηλό επίπεδο των PUFAs. Η καλή αναλογία των ω -3 και ω -6 το καθιστά ενδιαφέρον προϊόν για την ανθρώπινη διατροφή. Τα ω -3 και ω -6 είναι απαραίτητα για τον ανθρώπινο μεταβολισμό διότι χρησιμοποιούνται ως συστατικά των μεμβρανών (φωσφολιπίδια), σαν πρόδρομοι των εικοσανοειδών (τύπος λιπαρών οξέων) (Malacarne et al., 2002), σαν συνδέτες σε υποδοχείς μεμβράνης και παράγοντες μεταγραφής που ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων (Uniacke-Lowe, 2011). Έρευνα των Salimei et al., 2003 έδειξε ότι ο χαμηλός μέσος όρος του λίπους του ονογάλακτος εμφανίζει μια υψηλή ατομική μεταβλητότητα η οποία επηρεάστηκε από το χρόνο της μελέτης. Το λιπιδικό κλάσμα χαρακτηρίστηκε από υψηλά επίπεδα λινολεϊκού και λινολενικού οξέος.

Μέταλλα – Βιταμίνες

Τα ποσοστά συγκέντρωσης των μετάλλων στο γάλα του όνου είναι παρόμοια με το ανθρώπινο. Συγκεκριμένα ο μέσος όρος Ca:P (1.5) είναι ελαφρώς χαμηλότερος στο ονόγαλα από το ανθρώπινο και το γάλα του αλόγου. Οι συγκεντρώσεις των K, Na, Mg είναι παρόμοιες με το ανθρώπινο (Papademas et al., 2015). Οι συγκεντρώσεις των μακροστοιχείων στους όνους επηρεάζονται αρκετά από το στάδιο της γαλουχίας και παρατηρείται μια σταδιακή μείωση του ασβεστίου, μαγνησίου, φωσφόρου, νατρίου και καλίου από το τέλος της πρώτης εβδομάδας του θηλασμού. Στο ονόγαλα τα ιχνοστοιχεία που βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα είναι του χαλκού, τιτανίου και σιδήρου ενώ σε πιο χαμηλές τιμές είναι του βαρίου, ψευδαργύρου, λιθίου, μαγγανίου και μολύβδου (Uniacke-Lowe. T, 2011).

Το συνολικό περιεχόμενο σε βιταμίνες για τα γάλατα έχει σχέση με τη διατροφή της μητέρας προς τις βιταμίνες και αφορά περισσότερο τις υδατοδιαλυτές που περιέχονται στη τροφή και όχι τις λιποδιαλυτές. Στο γάλα του όνου το ποσοστό της βιταμίνης E είναι χαμηλό και μπορεί να μειωθεί περαιτέρω ύστερα από τη θέρμανση του γάλακτος, όπως και οι βιταμίνες B12 και B2 (ριβοφλαβίνης) (Uniacke-Lowe., 2011).

2.2.2 ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΜΕ ΒΙΟΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Το μικροβιολογικό προφίλ του ονογάλακτος θεωρείται ιδιαίτερα χαμηλό και παρουσιάζει απουσία των παθογόνων μικροοργανισμών όπως (*Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Enterobacteriaceae*) (Papademas et al., 2015). Πέρα από αυτό εμάς μας ενδιαφέρουν οι οργανισμοί οι οποίοι προσδίδουν ευεργετικές ιδιότητες από όλους τους υπόλοιπους οργανισμούς, οι οποίοι είναι τα οξυγαλακτικά.

2.2.2.1 ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον για το μικροβιολογικό προφίλ του ονογάλακτος, διαδραματίζουν τα οξύγαλακτικά βακτήρια, που μπορούν να αξιοποιηθούν για την ανάπτυξη βιολειτουργικών τροφίμων. Τα οξύγαλακτικά είναι Gram θετικά βακτήρια τα οποία δε σχηματίζουν σπόρους, καταλάση αρνητικά, ανέχονται τη μερική πίεση οξυγόνου, ζυμώνουν σάκχαρα με το γαλακτικό οξύ σαν ένα τελικό προϊόν και έχουν την ικανότητα να παράγουν πρωτεΐνες με μικροβιοκτόνες ιδιότητες που λέγονται βακτηριοσίνες (Wenjun et al., 2012; Axelsson 1993).

Τα οξύγαλακτικά είναι Gram⁺ βάκιλλοι και σχηματίζουν κόκκους, τα οποία μοιράζονται κοινά μεταβολικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά. Μπορούν και ζυμώνουν γλυκόζη κυρίως γαλακτικό οξύ ως το κύριο μεταβολικό προϊόν της ζύμωσης των υδατανθράκων (Wikipedia, Lactobacillales). Οι ομάδες των γαλακτοβακίλλων σύμφωνα με το μεταβολισμό τους είναι: **1)Ομοιοζυμωτικοί:** Βάκιλλοι που μετατρέπουν περισσότερο από 85% της γλυκόζης τους σε γαλακτικό οξύ με αρχική ένωση τη γλυκόζη **2)Ετεροζυμωτικοί:** Βάκιλλοι που μετατρέπουν λιγότερο από 50% της γλυκόζης σε γαλακτικό οξύ και σε σημαντικά ποσά αιθανόλης, οξικού οξέος και CO₂. **3)Ετεροζυμωτικά είδη:** Βάκιλλοι που παράγουν DL-γαλακτικό οξύ, οξικό οξύ και CO₂. Όλα τα οξύγαλακτικά αναπτύσσονται αναερόβια. Παρόλο που πολλά γένη παράγουν γαλακτικό οξύ ως πρωτογενές ή δευτερογενές τελικό προϊόν της ζύμωσης, ο όρος των οξύγαλακτικών διατίθεται στη τάξη των λακτοβακίλλων. Η τάξη των λακτοβακίλλων συμπεριλαμβάνει τα εξής γένη: στο πυρήνα είναι *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* και *Streptococcus* και πιο περιφερειακά *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Melissococcus*, , *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* (Wenjun et al., 2012; Axelsson 1993; Tannock 2004). Εικόνα 1 και 2.

Τα οξύγαλακτικά χαρακτηρίζονται από την ικανότητά τους να σχηματίζουν ισομερή του γαλακτικού οξέος από τη ζύμωση της γλυκόζης. Είναι gram-θετικά και είναι το κύριο

και τελικό προϊόν της ζύμωσης της ζάχαρης. Κατά τη διάρκεια των δύο τελευταίων δεκαετιών τα προβιοτικά (προαγωγή της υγείας) συμπεριλαμβάνονται σε διάφορους τύπους τροφίμων και ειδικά σε ζυμώμενα γάλατα. Πρέπει να ληφθούν υπόψη αρκετές πτυχές όπως η ασφάλεια καθώς και τα λειτουργικά και τεχνολογικά χαρακτηριστικά. Όσον αφορά την ασφάλεια περιλαμβάνει την προέλευση (υγιής γαστρεντερική οδός των ανθρώπων), μη παθογένεια και ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά. Τα λειτουργικά χαρακτηριστικά περιλαμβάνουν τη βιωσιμότητα και την επιμονή στη γαστρεντερική οδό. Πριν τα προβιοτικά στελέχη επιλεγθούν με βάση την ασφάλεια και τα λειτουργικά χαρακτηριστικά τους θα πρέπει να είναι σε θέση να κατασκευαστούν κάτω από ορισμένες βιομηχανικές συνθήκες. Θα πρέπει να επιβιώσουν και να διατηρήσουν τη λειτουργικότητά τους κατά την αποθήκευση και να μην υπάρχει παραγωγή δυσάρεστων οσμών στα τρόφιμα που ενσωματώνονται.

Συνοπτικά ο ρόλος των οξυγαλακτικών στα τρόφιμα μπορεί να αφορά:

Τα οξυγαλακτικά σύμφωνα με μελέτη των Garrido et al., 2015 χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο εδώ και αιώνες στη παραγωγή και διατήρηση τροφίμων και ως προβιοτικά για την προαγωγή της ανθρώπινης υγείας. Μερικά είδη αυτών των Gram⁺ βακτηρίων, τα οποία είναι αναγνωρισμένα από τον Αμερικανικό Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων(FDA) μπορούν να επιβιώσουν μέσω του γαστρεντερικού σωλήνα (GIT) και να αποικίσουν την εντερική οδό του ανθρώπου. Η παρούσα μελέτη έχει στόχο να δείξει ότι η χρήση των οξυγαλακτικών μηχανικής είναι μια πολλά υποσχόμενη εναλλακτική λύση καθώς και μια ασφαλή πλατφόρμα διανομής ανασυνδυασμένων πρωτεϊνών για τη θεραπεία ενός ευρέος φάσματος ασθενειών.

Οι γαλακτοβάκιλλοι διαφέρουν από το ένα είδος στο άλλο, με διαφορετική γενετική σύσταση και διαφορετικά μοτίβα πρόσφυσης και αποικισμού. Εκτός από το *Lactobacillus*, θεραπευτικές ιδιότητες έχουν και άλλοι οργανισμοί όπως μερικά είδη *Saccharomyces*, ζυμομύκητας και επιπλέον βακτήρια όπως *Bifidobacterium*, *Streptococcus thermophilus*. Ένα προβιοτικό πρέπει να είναι αβλαβές. Η ευρεία κατανάλωση των προβιοτικών προλαμβάνει την εξάπλωση των επικίνδυνων παθογόνων

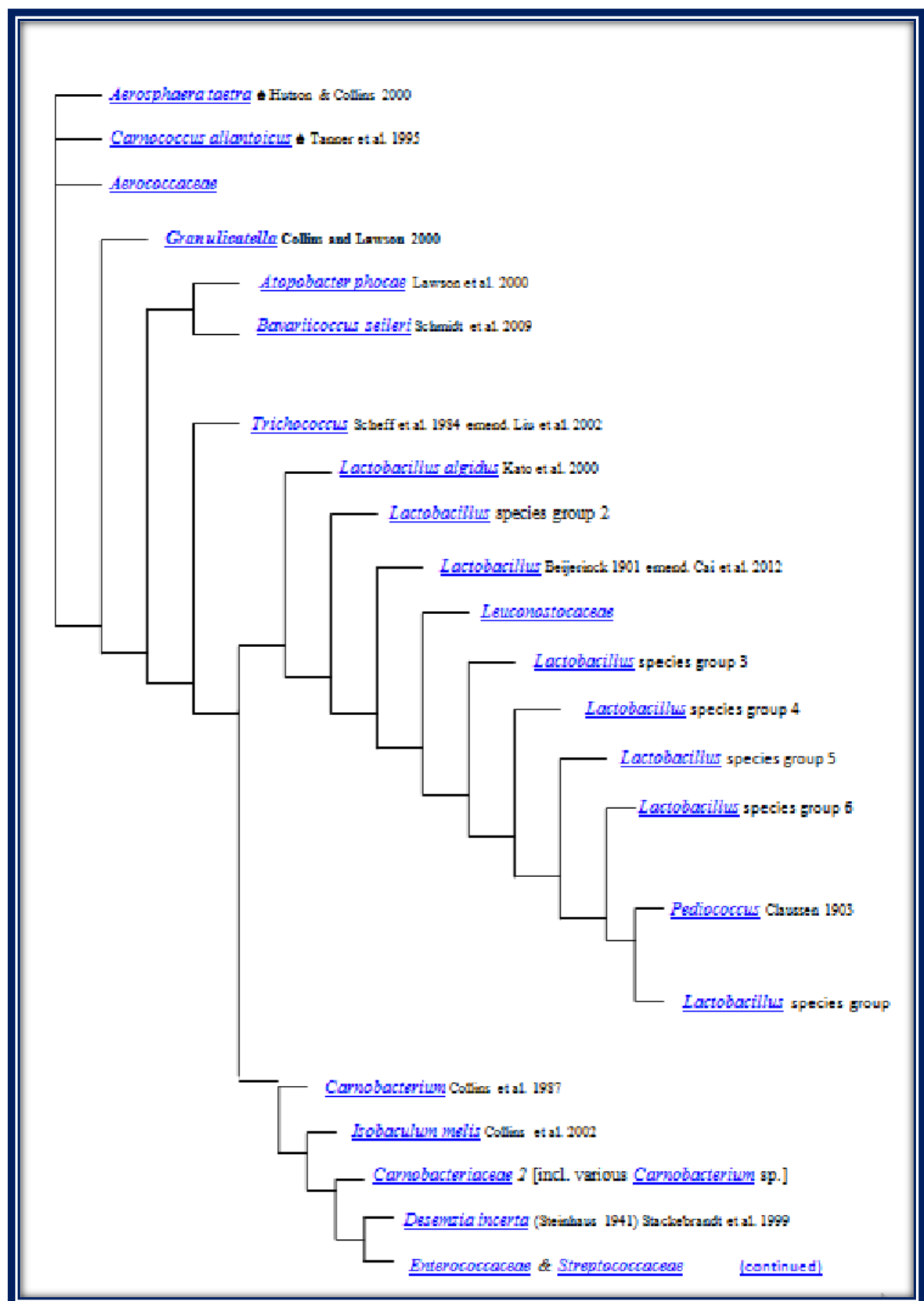
μικροοργανισμών. Τα προβιοτικά είναι χρήσιμα στη πρόληψη και τη θεραπεία γαστρεντερικών διαταραχών συμπεριλαμβάνοντας τη λοιμώδη διάρροια, αντιβιοτική διάρροια και τη διάρροια των ταξιδιωτών. Βάσει μελετών ασθενείς με φλεγμονώδεις νόσους και με το σύνδρομο του ευερέθιστου εντέρου, η θεραπεία με προβιοτικά μπορεί να τους βοηθήσει σημαντικά (Vanderhoof et al., 1998).

Σε μελέτη των Saarela et al., 2000, επισημαίνεται η ασφάλεια, η λειτουργικότητα και οι τεχνολογικές ιδιότητες των προβιοτικών βακτηρίων.

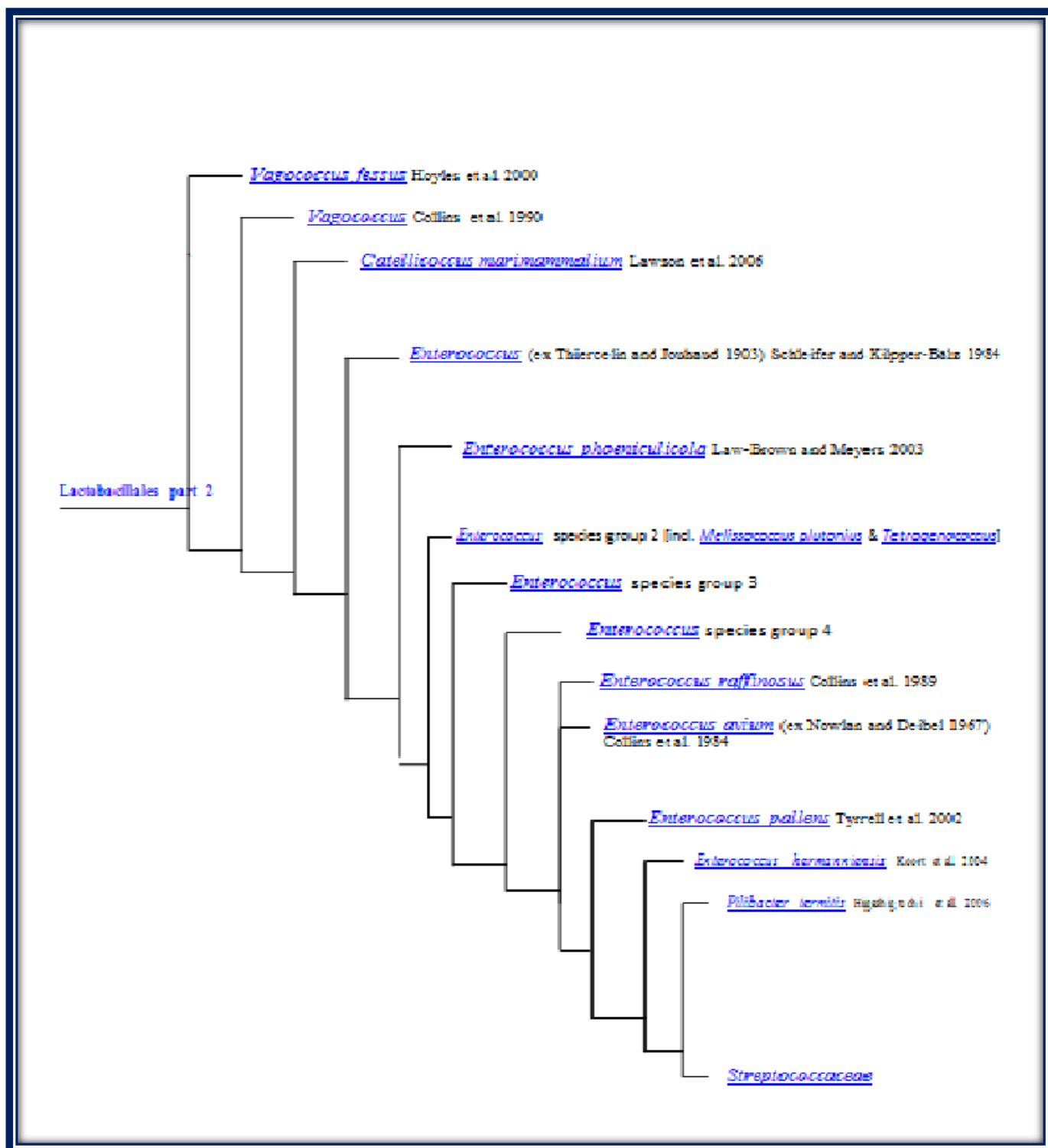
Τα οξυγαλακτικά έχουν πολλές ευεργετικές επιδράσεις όπως αντιμικροβιακές, έχουν την ικανότητα να ρυθμίζουν το ανοσοποιητικό καθώς και αντικαρκινική δραστηριότητα. Υπάρχουν ορισμένα είδη λακτοβακίλλων τα οποία έχουν αντιοξειδωτική δράση και είναι σε θέση να μειώσουν το κίνδυνο συσσώρευσης των ROS (reactive oxygen species), τα οποία είναι κάποια είδη αντίδρασης οξυγόνου και ραδιενεργά στοιχεία και έχουν κυρίαρχο ρόλο σε ασθένειες όπως ο καρκίνος, αθηροσκλήρωση και διαβήτης. Με αποτέλεσμα αυτά τα είδη λακτοβακίλλων τα οποία παρουσιάζουν αντιοξειδωτικές ικανότητες, να μειώνουν το κίνδυνο κατά την κατάποση της τροφής, καθώς τα οξυγαλακτικά αποδομούν το ανιόν υπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου. Στη συγκεκριμένη μελέτη λοιπόν επικεντρώθηκαν στην αντιοξειδωτική δράση στελεχών που παράγουν οξυγαλακτικά και διερεύννησαν τη διαδικασία της ζύμωσης του γάλακτος και την ανάπτυξη της αντιοξειδωτικής τους δράσης. Αυτό που απέδειξαν είναι ότι συνδυάζοντας ορισμένα στελέχη οξυγαλακτικών μπορεί να αυξηθεί περαιτέρω η αντιοξειδωτική δράση του ζυμώμενου γάλακτος (Virtanen, et al., 2006).

Μέχρι σήμερα, υπάρχει περιορισμένος αριθμός ερευνών σχετικά με την παρουσία οξυγαλακτικών στο ονόγαλα (Murua et al., 2013), που ανέφερε την απομόνωση και ταυτοποίηση του στελέχους *Lactobacillus plantarum* που μπορεί να είναι χρήσιμο στο σχεδιασμό νέων λειτουργικών τροφίμων με προβιοτικές δυνατότητες.

Σύμφωνα με μελέτη των Murua et al., (2013), το συμπέρασμα ήταν ότι το προϊόν απομόνωσης που παρουσιάζει υψηλό δυναμικό βακτηριοσίνης είναι το *Lactobacillus plantarum* LP08AD το οποίο μπορεί να είναι χρήσιμο για το σχεδιασμό νέων λειτουργικών τροφίμων με προβιοτικές ιδιότητες. Το συγκεκριμένο στέλεχος LP08AD δείχνει να έχει πιθανές ευεργετικές ιδιότητες (Murua et al., 2013). Βρίσκονται όπως προείπαμε στο γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, αποτελούν τη φυσιολογική χλωρίδα του ανθρώπου στη στοματική κοιλότητα , στον εντερικό σωλήνα και του κόλπου και διαδραματίζουν έναν ευεργετικό ρόλο. Τα βακτήρια γαλακτικού οξέος είναι από τις πιο σημαντικές ομάδες μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται στις ζυμώσεις τροφίμων. Συμβάλλουν στη γεύση και στην υφή των προϊόντων που έχουν υποστεί ζύμωση και αναστέλλουν την αλλοίωση των τροφίμων, παράγοντας ουσίες που αναστέλλουν την ανάπτυξη και μεγάλες ποσότητες γαλακτικού οξέος. Σύμφωνα με μελέτη των Aspri, Economou et al., (2016), αξιολογήθηκε το ονόγαλα ως η πηγή της ποικιλομορφίας *Enterococcus*, όπου απομονώθηκαν από νωπό γάλα, στελέχη οξυγαλακτικών. Η συγκεκριμένη μελέτη αποδεικνύει ότι υπάρχουν αυτόχθονα στελέχη *Enterococcus spp.*, όπως επίσης δείχνει ότι υπάρχουν τεχνολογικές και προβιοτικές ιδιότητες που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω από τη βιομηχανία τροφίμων στους τομείς της μικροβιολογίας τροφίμων και στα ζυμούμενα γαλακτοκομικά προϊόντα. Σε μελέτη των Saarela et al., 2000, επισημαίνεται η ασφάλεια, η λειτουργικότητα και οι τεχνολογικές ιδιότητες των προβιοτικών βακτηρίων. Σύμφωνα με τη μελέτη των Papademas et al., (2015), διερευνήθηκε η ικανότητα των εξής προβιοτικών *L. fermentum* ME-3 και *L. acidophilus* (ATCC4356) για τη ζύμωση παστεριωμένου ονογάλακτος διατηρώντας το σε ψυχρή αποθήκευση για 14 ημέρες ώστε να γίνει η δοκιμή των τελικών προϊόντων για τις αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές και οργανοληπτικές ιδιότητες. Τα οξυγαλακτικά παρουσίασαν το μεγαλύτερο μικροβιακό πληθυσμό. Το ονόγαλα θα μπορούσε να αξιοποιηθεί ως ένα καλό συστατικό βάσης για τα προβιοτικά και τα θεραπευτικά παρασκευάσματα διατροφής. Έτσι σε μελέτη εμβολιάσανε παστεριωμένο ονόγαλα με κάποια στελέχη *Lactobacillus rhamnosus*, με προβιοτικές ιδιότητες. Αυτό που απεδείχθη είναι ότι τα στελέχη του *Lb rhamnosus* παρέμειναν βιώσιμα μετά από 15 ημέρες αποθήκευσης (4° C) και χαμηλό pH (3.7 – 3.8) ενώ και η υψηλή λυσοζύμη επηρέασε εν μέρει την ανάπτυξη των στελεχών χωρίς οποιαδήποτε σημαντική επίδραση στην οξίνιση (Salimei et al., 2012).



Εικόνα 1. Ταξινόμηση λακτοβακίλλων



Εικόνα 2. Ταξινόμηση λακτοβακίλλων

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

3.1 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Για τον προσδιορισμό του μικροβιολογικού προφίλ ονογάλακτος συλλέχθηκαν 14 δείγματα από εκτροφεία όνων στην Ελλάδα. Η συλλογή δειγμάτων έγινε σε αποστειρωμένα μπουκάλια. Τα δείγματα για τη μεταφορά τους τοποθετήθηκαν σε ισοθερμικά κουτιά με παγοκύστες. Αναλύθηκαν για: Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, Εντεροβακτηριακά, Σταφυλόκοκκους, *Escherichia coli*, και Οξυγαλακτικά. Το μικροβιολογικό προφίλ αποτυπώθηκε με την εφαρμογή κλασσικών τεχνικών απομόνωσης, καταμέτρησης και ταυτοποίησης, ενώ τυχαία στελέχη ταυτοποιήθηκαν και με την εφαρμογή του Maldi-Tof.

Κατά την επικοινωνία με τους παραγωγούς για τη δειγματοληψία, συλλέχθηκαν πληροφορίες σχετικά με τον αριθμό των ζώων της εκτροφής και την ημερήσια παραγόμενη ποσότητα γάλακτος.

3.2 ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικά και όργανα

Διάλυμα μέγιστης ανάκτησης (BPW)

Διάλυμα δεκαδικών αραιώσεων σε MRD

Τρυβλία

Θρεπτικό υλικά: Plate Count Agar

TBX agar

MRS agar

VRBG agar

Baird Parker

Stomacher

Vortex

Πιπέτες των 1000μl και 100μl

Κλίβανοι 30° C, 37° C, 44° C

spreader

3.2.1 ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΟΝΟΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕ ΚΛΑΣΣΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Περίληπτικά το διάγραμμα που ακολουθήθηκε για την αποτύπωση του μικροβιολογικού προφίλ του ονογάλακτος για τους μικροοργανισμούς (Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, Εντεροβακτηριακά, *Escherichia coli*, Σταφυλόκοκκους, Οξυγαλακτικά), των δειγμάτων, βάσει των κλασσικών τεχνικών ήταν το εξής:

- 1) αρχικά πήραμε για τον κάθε μικροοργανισμό ξεχωριστά από 2 στείρα τρυβλία 10^0 και 10^{-1} αντίστοιχα. Με εξαίρεση στην Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα που κάναμε 3 αραιώσεις (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) και βάλαμε τα θρεπτικά υποστρώματα στους κλιβάνους. Πρώτα στους 100°C για 1 ώρα και μετά στους 50°C για 30 λεπτά.
- 2) Ακολούθησε η δημιουργία αραιώσεων (9ml MRD + 1ml ονόγαλα) → 1:10
- 3) Στη συνέχεια εμβολιάσαμε στα στείρα τρυβλία. Στο τρυβλίο με αραιώση 10^0 με 1ml ονόγαλα και 10^{-1} με 1ml αραιωμένου ονογάλακτος σε MRD.
- 4) Αφότου ολοκληρώθηκε το 3^ο βήμα, μέσα σε 30 λεπτά κάναμε έγχυση των θρεπτικών υποστρωμάτων στα αντίστοιχα τρυβλία. Αναδεύσαμε και αφήσαμε να σταθεροποιηθούνε για 15-20 λεπτά.
- 5) Ακολουθεί έγχυση 0,1ml ονογάλακτος και 0,1 αραιωμένου ονογάλακτος στα τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα Baird Parker αραιώσεων 10^0 και 10^{-1} αντίστοιχα. Μόλις κάναμε την έγχυση τα στρώσαμε με spreader, τα αφήσαμε 15λεπτά και ακολούθησε επώαση στους 37°C για 48 ώρες.
- 6) Στη συνέχεια του 4^{ου} βήματος, αφότου σταθεροποιήθηκαν τα θρεπτικά υποστρώματα τα τρυβλία με MRS άγαρ επωάστηκε στους 30° C για 3-5ημέρες, τα τρυβλία με την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα επωάστηκαν στους 30° C για 72

ώρες, τα τρυβλία με Εντεροβακτηριακά επωάστηκαν στους 30° C για 24 ώρες και τα τρυβλία με *Escherichia coli* επωάστηκαν στους 37° C για 48 ώρες.

- 7) Εξαιρούνται τα τρυβλία με οξυγαλακτικά και Εντεροβακτηριακά στα οποία αφού σταθεροποιήθηκαν κάνω επιστοιβάδευση με MRS και VRBG Agar αντίστοιχα και μετά από 15 λεπτά τα βάλαμε για επώαση.
- 8) Τέλος ακολούθησαν επιβεβαιωτικές δοκιμές με τεχνικές κλασσικής μικροβιολογίας που αναφέρονται πιο κάτω και επιβεβαιωτικές δοκιμές με τη πιο σύγχρονη τεχνική, τη Maldi-Tof.

3.2.1.1 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΗΣ ΜΕΣΟΦΙΛΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ

Μέθοδος ενσωμάτωσης

Δημιουργία αραιώσης: 1:10 → 9ml MRD + 1ml ονόγαλα

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ MRD (Maximum Recovery Diluent): έγινε διάλυση 9,5gr MRD σε 1lt απεσταγμένο νερό.

Για το προσδιορισμό της Ολικής Μεσόφιλης Χλωρίδας χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Plate Count Agar.

- Παρασκευή PCA: Το άγαρ παρασκευάζεται κατά τη διάλυση 36gr υποστρώματος σε 1lt απεσταγμένο νερό.
- Εμβολιασμός: έγινε εμβολιασμός σε στείρα τρυβλία 1ml από τις αραιώσεις (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}), στη συνέχεια έγινε έγχυση του θρεπτικού υποστρώματος, έγινε ανάδευση και αφήσαμε να στερεοποιηθεί για 20 λεπτά.
- Επώαση: αφού στερεοποιήθηκε το άγαρ, επωάστηκε στους 30°C για 72 ώρες.
- Καταμέτρηση των αποικιών: αφότου επωάστηκε έγινε καταμέτρηση των αποικιών.

3.2.1.2 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ *Enterobacteriaceae* (Εντεροβακτηριακών)

Μέθοδος ενσωμάτωσης

Δημιουργία αραιώσης: 1:10 → 9ml MRD + 1ml ονόγαλα

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ MRD (Maximum Recovery Diluent): έγινε διάλυση 9,5gr MRD σε 1lt απεσταγμένο νερό.

Για το προσδιορισμό των Εντεροβακτηριακών χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό VRBG Agar (Violet Red Glucose Agar)

- Παρασκευή VRBGA: το άγαρ παρασκευάζεται κατά τη διάλυση 38,5gr υποστρώματος σε 1lt απεσταγμένο νερό και τοποθετείται σε κωνική φιάλη να βράσει.
- Εμβολιασμός: έγινε εμβολιασμός σε στείρα τρυβλία 1ml από τις αραιώσεις(10^{-1}) και (10^0),στη συνέχεια έγινε έγχυση του θρεπτικού υποστρώματος, έγινε ανάδευση και αφήσαμε να στερεοποιηθεί για 20 λεπτά. Αφού σταθεροποιήθηκε κάναμε και επιστοιβάδευση με άλλα 9-10ml VRBG Agar.
- Επώαση: αφού στερεοποιήθηκε το άγαρ, επώαστηκε στους 30°C(μόνο για γάλα) για 24 ώρες.
- Καταμέτρηση των αποικιών: αφότου επώαστηκε έγινε καταμέτρηση των ροζ αποικιών.

3.2.1.3 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΩΝ ΘΕΤΙΚΩΝ ΣΤΗ ΠΗΚΤΑΣΗ

Μέθοδος επιφανειακής επίστρωσης

Δημιουργία αραιώσης: 1:10 → 9ml MRD + 1ml ονόγαλα

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ MRD (Maximum Recovery Diluent): έγινε διάλυση 9,5gr MRD σε 1lt απεσταγμένο νερό.

Για το προσδιορισμό των σταφυλόκοκκων χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό BAIRD PARKER(BP).

- Εμβολιασμός: (ξεκινώντας από τις αραιώσεις 10^0 και 10^{-1}) 0,1ml από κάθε αραιώση στο κέντρο από κάθε τρυβλίο με εκλεκτικό θρεπτικό υλικό Baird-

Parker. Χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο κεκομμένο ραβδίο για τη διασπορά του δείγματος σε όλη την επιφάνεια του τρυβλίου.

- Επώαση: αφού στερεοποιήθηκε το άγαρ, επώαστηκε στους 37°C για 44⁺ ώρες
- Καταμέτρηση των αποικιών: αφότου επώαστηκε έγινε καταμέτρηση των τυπικών(μαύρες με άλω) και άτυπων(μαύρες χωρίς άλω) αποικιών.

3.2.1.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ *Escherichia coli*

Μέθοδος ενσωμάτωσης

Δημιουργία αραιώσης: 1:10 → 9ml MRD + 1ml ονόγαλα

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ MRD (Maximum Recovery Diluent): έγινε διάλυση 9,5gr MRD σε 1lt απεσταγμένο νερό.

Για το προσδιορισμό *Escherichia coli* χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό TBX

- Παρασκευή TBX: Το άγαρ παρασκευάζεται κατά τη διάλυση 36,6gr υποστρώματος σε 1lt απεσταγμένο νερό.
- Εμβολιασμός: έγινε εμβολιασμός σε στείρα τρυβλία 1ml από τις αραιώσεις(10⁻¹) και (10⁰) ,στη συνέχεια έγινε έγχυση του θρεπτικού υποστρώματος, έγινε ανάδευση και αφήσαμε να στερεοποιηθεί για 20 λεπτά.
- Επώαση: αφού στερεοποιήθηκε το άγαρ, επώαστηκε στους 37°C για 1 ώρα και στη συνέχεια στους 44°C για ένα 24h
- Καταμέτρηση των αποικιών: αφότου επώαστηκε έγινε καταμέτρηση των αποικιών. Ύποπτες αποικίες μπλε-πράσινες.

3.2.1.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ

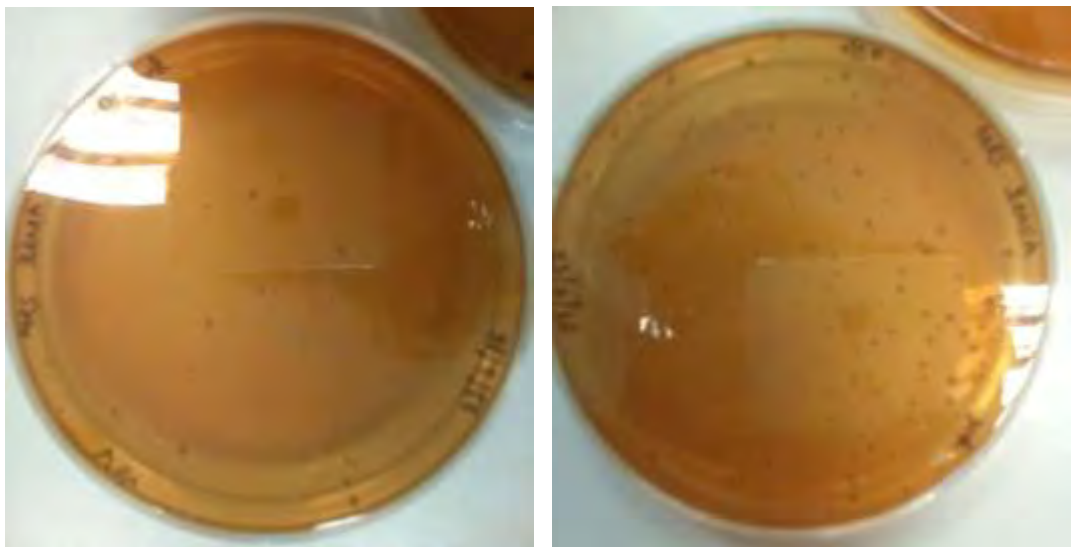
Μέθοδος ενσωμάτωσης

Δημιουργία αραιώσης: 1:10 → 9ml MRD + 1ml ονόγαλα

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ MRD (Maximum Recovery Diluent): έγινε διάλυση 9,5gr MRD σε 1lt απεσταγμένο νερό.

Για το προσδιορισμό των οξυγαλακτικών χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό MRS Agar

- Παρασκευή MRS: Το άγαρ παρασκευάζεται κατά τη διάλυση 70gr υποστρώματος σε 1lt απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια αφού βράσει το τοποθετούμε σε μπουκάλι 250ml και το βάζουμε στο κλίβανο στους 100°C για 1μιση ώρα μέχρι να διαλυθεί και μετά στους 50°C.
- Εμβολιασμός: έγινε εμβολιασμός σε στείρα τρυβλία 1ml από τις αραιώσεις (10^0 , 10^{-1}), στη συνέχεια έγινε έγχυση του θρεπτικού υποστρώματος, έγινε ανάδευση και αφήσαμε να στερεοποιηθεί για 20 λεπτά. Αφού σταθεροποιήθηκε κάναμε και επιστοιβάδευση με άλλα 9-10ml MRS agar.
- Επώαση: αφού στερεοποιήθηκε το άγαρ, επώαστηκε στους 30°C για 3-5 ημέρες.
- Καταμέτρηση των αποικιών: αφότου επώαστηκε έγινε καταμέτρηση των αποικιών.



Εικόνα 3. Καλλιέργεια οξυγαλακτικών σε αραιώσεις (10^0 και 10^{-1})

3.2.2 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ

3.2.2.1 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΤΙΚΕΣ ΔΟΚΙΜΕΣ ΓΙΑ ΣΤΑΦΥΛΟΚΟΚΚΟΥΣ ΘΕΤΙΚΟΥΣ ΣΕ ΠΗΚΤΑΣΗ

ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ σταφυλόκοκκων και εντεροβακτηριακών σε Nutrient Agar .

Ανακαλλιέργεια σε Nutrient Agar κάναμε και για τα οξυγαλακτικά και για E. coli.

Πήραμε με κρίκο την αποικία από το τρυβλίο με το σταφυλόκοκκο και τη στρώσαμε στο τρυβλίο με Nutrient Agar. Το ίδιο κάναμε και για τα εντεροβακτηριακά. Στη συνέχεια επώαστηκαν στους 37°C για ένα 24h. Ανακαλλιέργεια σε Nutrient Agar κάναμε και για τα οξυγαλακτικά και για E. coli.

Μέθοδος ISO για ανακαλλιέργεια πηκτάσης: με πιπέτα 10ml ρίχνω σε BBL 15ml στείρο νερό σε φιαλίδιο και το τοποθετώ στο voltex μέχρι να διαλυθεί. Στη συνέχεια με πιπέτα 500ml παίρνω Rabbit plasma και γεμίζω φαλκονάκια.

ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΗ ΣΕ Brain Heart Infusion Broth(BHIB)

Για τη παρασκευή BHIB διαλύθηκαν 37gr σε 1lt απεσταγμένο νερό.

- Στη συνέχεια πήραμε με κρίκο αποικία από την ανακαλλιέργεια σταφυλόκοκκου και το αναδεύσαμε στο BHIB.
- Πήραμε με νύξη αποικία από τα εντεροβακτηριακά και τα αναδεύσαμε στο BCP → γλυκόζη

Τα επώασαμε στους 37°C για ένα 24h. Μετά την επώαση του ενός 24ώρου κάναμε έγχυση 50μl στο Rabbit plasma και τα επώασαμε για 4h (για να δούμε αν έπηξαν) και στη συνέχεια για 24h → ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΠΗΚΤΑΣΗΣ ΣΕ RABBIT PLASMA για να δούμε αν ο σταφυλόκοκκος είναι θετικός σε πηκτάση

Και για τα εντεροβακτηριακά μετά την επώαση του ενός 24ώρου με τη γλυκόζη, αν από μωβ γίνει κίτρινο τότε είναι → ΘΕΤΙΚΟ

3.2.2.2 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΗ ΓΙΑ ΕΝΤΕΡΟΒΑΚΤΗΡΙΑΚΑ

ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ εντεροβακτηριακών σε Nutrient Agar

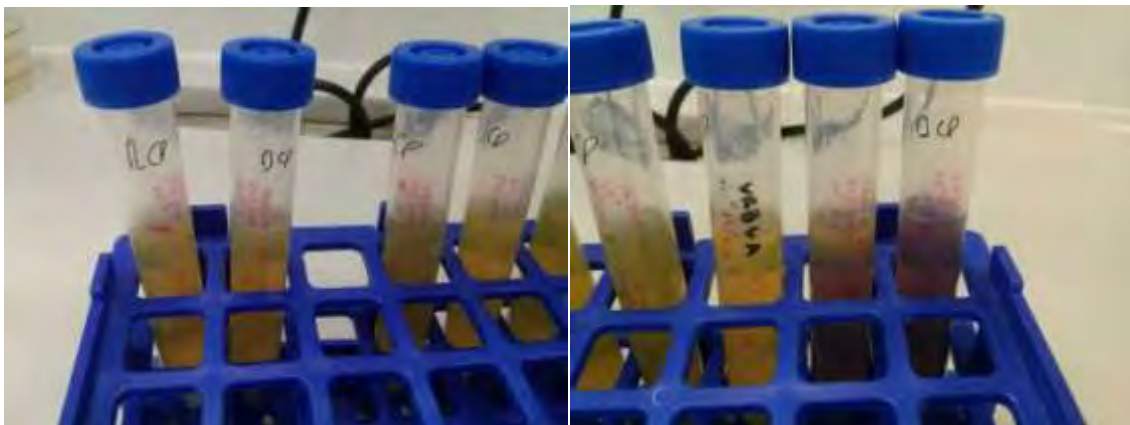
Πήραμε με κρίκο την αποικία από το τρυβλίο με τα εντεροβακτηριακά και τη στρώσαμε στο τρυβλίο με Nutrient Agar. Στη συνέχεια επωάστηκαν στους 37°C για ένα 24h.

ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΤΙΚΗ ΔΟΚΙΜΗ ΣΕ Brain Heart Infusion Broth(BHIB)

Για τη παρασκευή BHIB διαλύθηκαν 37gr σε 1lt απεσταγμένο νερό.

- Πήραμε με νύξη αποικία από τα εντεροβακτηριακά και τα αναδεύσαμε στο BCP → γλυκόζη
- Τα επωάσαμε στους 37°C για ένα 24h.

Μετά την επώαση του ενός 24ώρου με τη γλυκόζη, αν από μωβ γίνει κίτρινο τότε είναι → ΘΕΤΙΚΟ



Εικόνα 4. Επιβεβαιωτικές δοκιμές για εντεροβακτηριακά με BCP(ζύμωση γλυκόζης θετικών)

3.2.2.3 Maldi – Tof

Η ταυτοποίηση των Εντεροβακτηριακών, Σταφυλόκοκκων, οξυγαλακτικών και *Escherichia coli*, αφότου γίνανε οι ανακαλλιέργειές τους και επώαστηκαν στους 37°C για ένα 24ώρο, έγινε με τη τεχνική Maldi – Tof.

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, οι αποικίες των δειγμάτων που έχουμε συλλέξει, καλλιεργούνται σε αιματούχο άγαρ, στους 37° C, κάτω από αερόβιες συνθήκες και διαλύονται σε 300μL δισαπεσταγμένου νερού, στο οποίο έχουν προστεθεί 900μL καθαρής αιθανόλης. Το μίγμα φυγοκεντρείται στις 12000 στροφές για 2 λεπτά και το υπερκείμενο απορρίπτεται. Ακολουθώς, 10μL μυρμηκικού οξέος (70%) προστίθενται και αναμιγνύονται έντονα με μία πιπέτα πριν τη προσθήκη 10μL ακετονιτριλίου στο μίγμα. Το μίγμα φυγοκεντρείται ξανά στις 12000 στροφές για 2 λεπτά. Ένα μικρόλιτρο από το υπερκείμενο τοποθετείται σ' ένα χαλύβδινο δίσκο και αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Κάθε δείγμα υπερκαλύπτεται με 2μL κορεσμένου διαλύματος α-κυανο-4υδροξυ-κινναμωμικού (3 φαινυλο – 2 προπενικού) οξέος σε 50% ακετονιτρίλιο – 2,5% τριφλουρο – οξικό οξύ και αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, βάζουμε τα δείγματα στο μηχάνημα του MALDI - TOFF προς ανάλυση. Το δείγμα μας θεωρείται αξιόπιστο όταν το σκορ που προκύπτει μετά την ανάλυση των δειγμάτων από το μηχάνημα του MALDI – TOFF είναι μεγαλύτερο ή ίσο από τον αριθμό 2000.

3.3 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ

Για την επεξεργασία των αναλυτικών αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα excel προκειμένου να προσδιοριστούν περιγραφικοί στατιστικοί δείκτες ως μέσος όρος με μέση τιμή (SD), καθώς και για να αναπτυχθούν σχετικά διαγράμματα με τα αναλυτικά αποτελέσματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Από τις 10 εκτροφές που υπάρχουν καταγεγραμμένες , πήραμε 14 δείγματα από 7 εκτροφές, που αντιστοιχεί σε ποσοστό αντιπροσωπευτικότητας 70%. Οι εκτροφές που συμμετείχαν προερχόταν από διάφορα γεωγραφικά διαμερίσματα της Ελλάδας , όπως απεικονίζονται, στο χάρτη στην Εικόνα 5.



***Εικόνα 5 .**Απεικόνιση περιοχών της Ελλάδας από τις οποίες συλλέχθηκαν τα δείγματα ονογάλακτος*

Σύμφωνα με πληροφορίες που πήραμε από τις εκτροφές στην Ελλάδα από τα δείγματα που λάβαμε ονογάλακτος για τη διεκπαιραίωση του πειράματος στη παρούσα εργασία ,η διατροφή των ζώων περιλαμβάνει καρπούς βρώμης, κριθαριού, άχυρο, πίτυρα σιταριού, σανό ,πλάκες λήξεως όπου περιέχουν βιταμίνες και ιχνοστοιχεία η βόσκηση είναι ελεύθερη και δεν τους παρέχεται πρωτεΐνη εκτός από συγκεκριμένες περιόδους της ζωής τους, διότι τους δημιουργεί πρόβλημα στις αρθρώσεις.

Στον πίνακα 4.1, αναφέρονται οι περιοχές που πήραμε δείγματα, ο πληθυσμός των ζώων και η ποσότητα παραγωγής γάλακτος (%) ημερησίως.

Πίνακας 4.1. Ποσότητα παραγόμενου γάλακτος ημερησίως και πληθυσμός ζώων ανά περιοχή

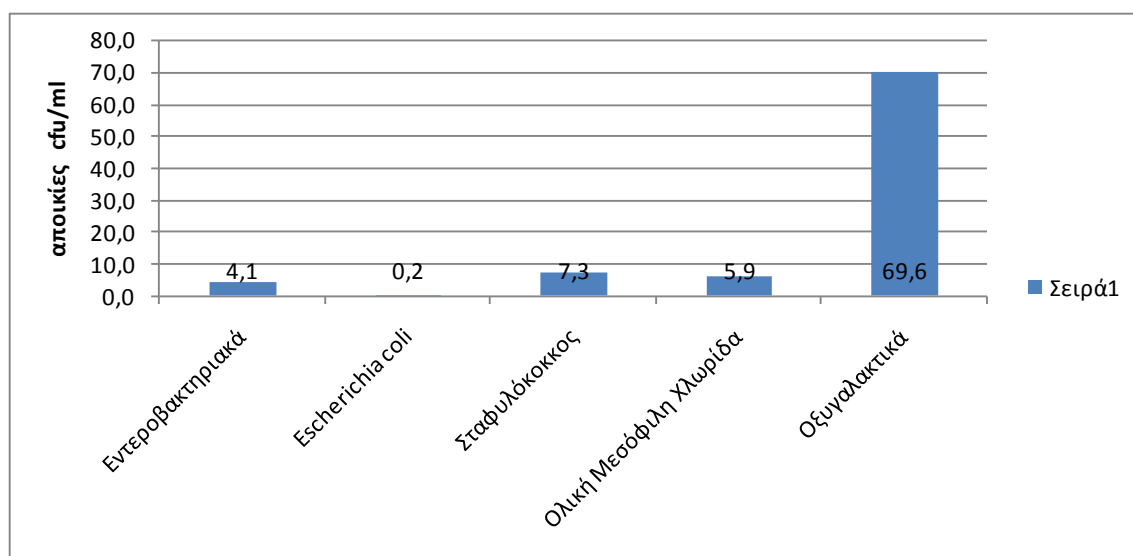
ΠΕΡΙΟΧΗ	ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΖΩΩΝ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΛΑΚΤΟΣ / ΗΜΕΡΗΣΙΩΣ
Μελιγαλά Μεσσηνίας	50	5-6 kg / ημέρα
Αμυγδαλιές Ηλείας	35	3-8 kg/ ημέρα
Νιγρίτα Σερρών	250	600- 1kg/ ημέρα
Επίδαυρος Αργολίδα	30	20kg/ ημέρα
Οινόη Κοζάνης	140	500kg / ημέρα
Καρδίτσα Θεσσαλία	50	5-6kg/ ημέρα
Καλαμπάκα	40	4-5kg/ ημέρα

4.2 ΓΕΝΙΚΟ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΟΝΟΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Στο πίνακα 4.2 αναφέρονται μέσες τιμές και διακύμανση στις παραμέτρους του μικροβιακού προφίλ που ελέγχθηκαν, ενώ στο διάγραμμα 4.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα σε γράφημα.

Πίνακας 4.2 μικροβιακό προφίλ ονογάλακτος (n=14) με μέσες τιμές και διακύμανση

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	Δείγμα 1 cfu/ml	Δείγμα 2 cfu/ml	Δείγμα 3 cfu/ml	Δείγμα 4 cfu/ml	Δείγμα 5 cfu/ml	Δείγμα 6 cfu/ml	Δείγμα 7 cfu/ml	Δείγμα 8 cfu/ml	Δείγμα 9 cfu/ml	Δείγμα 10 cfu/ml	Δείγμα 11 cfu/ml	Δείγμα 12 cfu/ml	Δείγμα 13 cfu/ml	Δείγμα 14 cfu/ml	ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ cfu/ml	ΔΙΑΚΥΜΑΝΣΗ
Εντεροβακτηριακά	(10 ⁰) 0	(10 ⁻¹) 1	(10 ⁻¹) 13	(10 ⁻¹) 33	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁻¹) 5	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 1	(10 ⁻³) 2	(10 ⁻⁴) 4	(10 ⁰) 0	4,1	76,0
<i>Escherichia coli</i>	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁻¹) 3	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	0,2	0,6
Σταφυλόκοκκος	(10 ⁻¹) 2	(10 ⁰) 1	(10 ⁰) 78	(10 ⁻¹) 1	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁻¹) 7	(10 ⁻¹) 2	(10 ⁰) 11	7,3	395,3
Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα	(10 ⁻³) 75	(10 ⁻³) 5	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁻³) 1	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁻³) 2	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	5,9	368,8
Οξυγαλακτικά	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 363	(10 ⁰) 250	(10 ⁰) 1	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 2	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 350	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 2	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 0	(10 ⁰) 7	69,6	17780,4

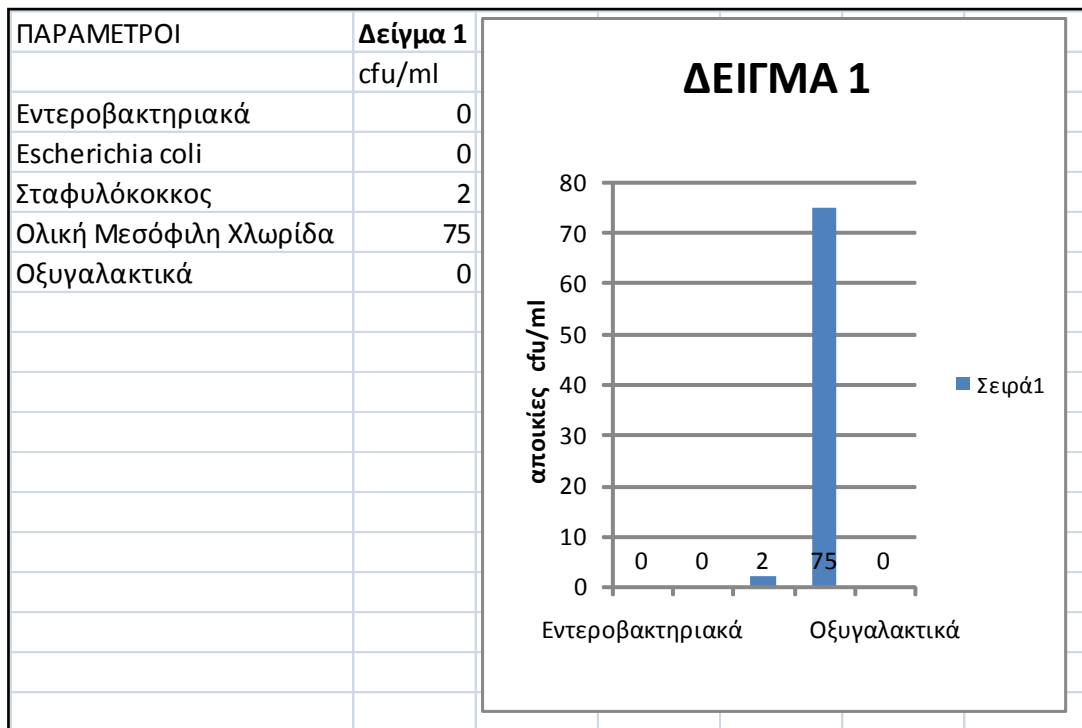


Διάγραμμα 4.1.1 Μικροβιολογικό προφίλ ονογάλακτος (n=14) μέση τιμή και διακύμανση

4.3 ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΠΡΟΦΙΛ ΑΝΑ ΔΕΙΓΜΑ ΜΕ ΚΛΑΣΣΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

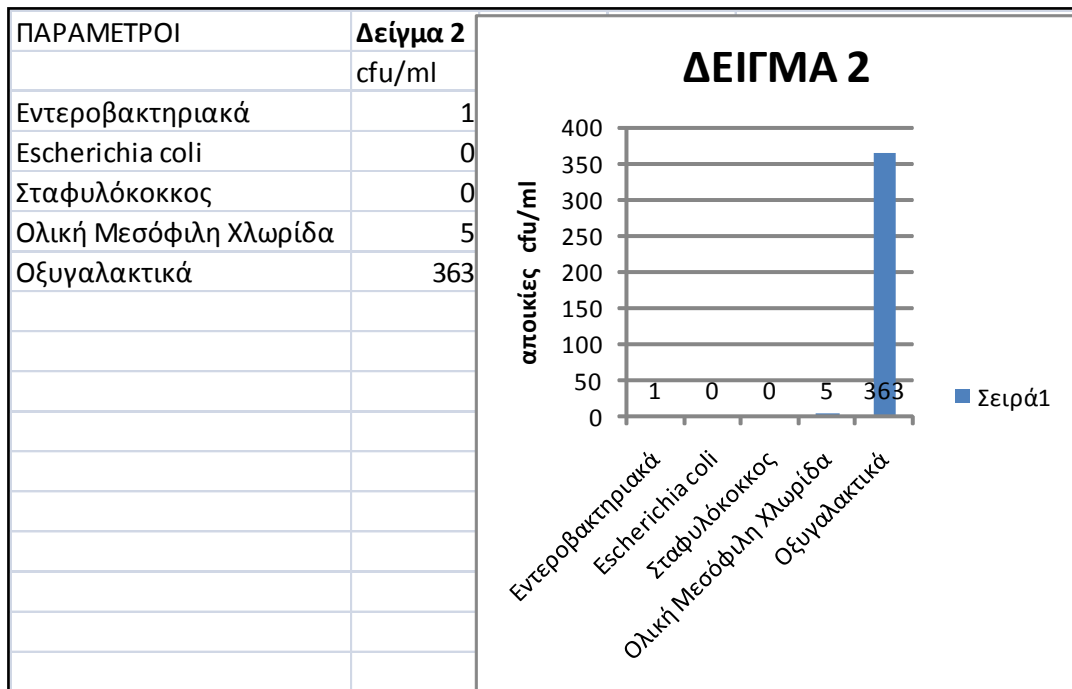
Αναλυτικά, στα πιο κάτω διαγράμματα (4.1.2 – 4.1.16) και στους πίνακες(4.3 – 4.17) αποτυπώνονται οι προσδιορισμοί που έγιναν για το μικροβιολογικό προφίλ του ονογάλακτος και για εντεροβακτηριακά έδειξε πολύ χαμηλό μικροβιακό προφίλ όπως και για σταφυλόκοκκο και Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα, *Escherichia coli* βρέθηκε σε ένα μόνο δείγμα ενώ έχουν βρεθεί οξυγαλακτικά στα αναλυθέντα δείγματα.

Πίνακας 4.3 μικροβιακό φορτίο δείγματος 1



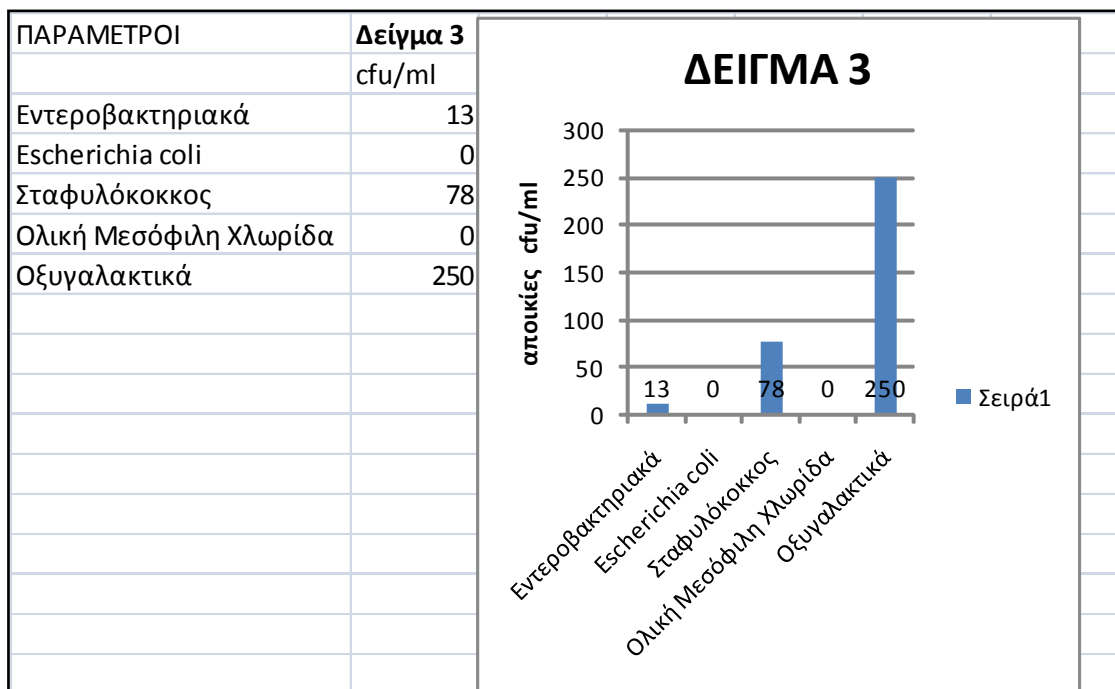
Διάγραμμα 4.1.2 Μικροβιακό φορτίο δείγματος 1

Πίνακας 4.4 Μικροβιακό φορτίο δείγματος 2



Διάγραμμα 4.1.3 Μικροβιακό φορτίο δείγματος 2

Πίνακας 4.5 Μικροβιακό φορτίο δείγματος 3



Διάγραμμα 4.1.4 Μικροβιακό φορτίο δείγματος 3

Πίνακας 4.6 Μικροβιακό φορτίο δείγματος 4

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	Δείγμα 4 cfu/ml
Εντεροβακτηριακά	33
Escherichia coli	3
Σταφυλόκοκκος	1
Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα	0
Οξυγαλακτικά	1

ΔΕΙΓΜΑ 4

Οργανισμός	Αποικίες (cfu/ml)
Εντεροβακτηριακά	33
Escherichia coli	3
Σταφυλόκοκκος	1
Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα	0
Οξυγαλακτικά	1

Διάγραμμα 4.1.5 Μικροβιακό φορτίο δείγματος 4

Πίνακας 4.7 Μικροβιακό φορτίο δείγματος 5

[illegible]

Διάγραμμα 4.1.6 Μικροβιακό φορτίο δείγματος 5

4.4 ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στο πίνακα 4.18 απεικονίζονται οι ταυτοποιήσεις στελεχών από τα αναλυθέντα δείγματα με κλασσικές δοκιμές της μικροβιολογίας και με τη σύγχρονη τεχνική MALDI – TOF.

Πίνακας 4.17 Ταυτοποιήσεις αναλυθέντων μικροοργανισμών με κλασσικές δοκιμές μικροβιολογίας

		ΔΟΚΙΜΕΣ ΚΛΑΣΣΙΚΗΣ ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ	
	Μ.Ο		
Δ 1	Σταφυλόκοκκος	-	Δοκιμή: παραγωγή (+) στη πηκτάση σε Rabbit plasma
Δ 2	Σταφυλόκοκκος	-	Δοκιμή: παραγωγή (+) στη πηκτάση σε Rabbit plasma
Δ 3	Εντεροβακτηριακά	+	Δοκιμή BCP(ζύμωση γλυκόζης θετικών)
	Σταφυλόκοκκος	-	Δοκιμή:παραγωγή (+) στη πηκτάση σε Rabbit plasma
Δ 4	Εντεροβακτηριακά	+	Δοκιμή BCP(ζύμωση γλυκόζης θετικών)
	Σταφυλόκοκκος	-	Δοκιμή:παραγωγή (+) στη πηκτάση σε Rabbit plasma
Δ 8	Σταφυλόκοκκος	-	Δοκιμή:παραγωγή (+) στη πηκτάση σε Rabbit plasma
Δ 9	Εντεροβακτηριακά	+	Δοκιμή BCP (ζύμωση γλυκόζης θετικών)
Δ 11	Εντεροβακτηριακά	-	Δοκιμή BCP(ζύμωση γλυκόζης θετικών)
Δ 12	Εντεροβακτηριακά	-	Δοκιμή BCP(ζύμωση γλυκόζης θετικών)
	Σταφυλόκοκκος	-	Δοκιμή:παραγωγή (+) στη πηκτάση σε Rabbit plasma
Δ 13	Εντεροβακτηριακά	-	Δοκιμή BCP(ζύμωση γλυκόζης θετικών)
	Σταφυλόκοκκος	-	Δοκιμή:παραγωγή (+) στη πηκτάση σε Rabbit plasma
Δ 14	Εντεροβακτηριακά	+	Δοκιμή BCP(ζύμωση γλυκόζης θετικών)
	Σταφυλόκοκκος	-	Δοκιμή:παραγωγή (+) στη πηκτάση σε Rabbit plasma

Πίνακας 4.18 Ταυτοποιήσεις αναλυθέντων μικροοργανισμών με τη τεχνική Maldi - ToF

ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ MALDI – TOF			
	M.O	ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΘΕΝΤΑ ΕΙΔΗ	SCORE
Δ 1	Σταφυλόκοκκος	a,b,c: <i>Staphylococcus epidermidis</i>	a : 1.691, b: 1.515, c: 1.745
Δ 2	Σταφυλόκοκκος	<i>Staphylococcus succinus</i>	2.084, 2.061
	Οξυγαλακτικά	a: <i>Enterococcus faecium</i> b,c: <i>lactococcus lactis</i> d: <i>enterococcus faecalis</i>	a: 1.788, b: 1.917, c: 1.901, d: 1.854
Δ 3	Εντεροβακτηριακά	a: <i>Klebsiella oxytoca</i> , b: <i>Raoultella ornithinolytica</i> , c: <i>Acinetobacter tjernberdiae</i> , d: <i>Klebsiella oxytoca</i>	a : 2.421, 2.329, 2.425, b: 2.477, c: 1.77, d: 2.367, e: 2.172
	Σταφυλόκοκκος	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1.36
	Οξυγαλακτικά	a, b,d,e,f,g,i: <i>lactococcus lactis</i> , c: <i>Enterococcus malodoratus</i> , g,h: <i>Enterococcus faecalis</i>	a : 2.18, b: 2.105, c: 2.111, d: 2.162, e: 2.067, f: 1.411, g: 2.132, h: 1.492, i: 2.01
Δ 4	Εντεροβακτηριακά	a: <i>Escherichia coli</i> b: <i>Raoultella ornithinolytica</i>	a: 2.488, b: 2.488
	Σταφυλόκοκκος	a,b: <i>Staphylococcus chromogenes</i> c: <i>Staphylococcus spp.</i>	a : 1.965, b: 1.794, c: 1.519,
	E.coli	<i>Escherichia coli</i>	2.389, 2.422, 2.39
	Οξυγαλακτικά	<i>Lactococcus lactis</i>	2.143, 2.129
Δ 7	Οξυγαλακτικά	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.444, 2.472
Δ 8	Σταφυλόκοκκος	a: <i>staphylococcus haemolyticus</i> b: <i>staphylococcus epidermidis</i>	a: 2.227, b: 2.135
Δ 9	Εντεροβακτηριακά	a: <i>staphylococcus capitis</i> b: <i>bacillus simplex</i>	a: 2.195, b: 1.85
	Οξυγαλακτικά	<i>Enterococcus faecalis</i>	2.100
Δ 11	Εντεροβακτηριακά	a: <i>staphylococcus warneri</i> b: <i>bacillus simplex</i>	a: 1.905, b: 1.762
	Οξυγαλακτικά	<i>Enterococcus faecium</i>	2.485, 2.432
Δ 12	Εντεροβακτηριακά	a,b: <i>Pseudomonas syxantha</i> c: <i>Pseudomonas proteolytica</i> d: <i>Pseudomonas libanensis</i>	a: 2.083, b: 2.074, c: 2.145, d: 2.046
	Σταφυλόκοκκος	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	2.319, 2.02, 2.214, 2.11
Δ 13	Εντεροβακτηριακά	a,b: <i>Pseudomonas proteolytica</i> c: <i>Pseudomonas azotoformans</i> d: <i>Pseudomonas syxantha</i> e: <i>Pseudomonas tolaasii</i>	a: 2.161, b: 2.373, c: 1.908, d: 2.151, e: 1.992
	Σταφυλόκοκκος	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	2.094, 2.208, 2.143, 1.997
Δ 14	Εντεροβακτηριακά	<i>Serratia liquefaciens</i>	2.433, 2.394, 2.336
	Σταφυλόκοκκος	a: <i>staphylococcus hyicus</i> b: <i>staphylococcus xylosus</i> c: <i>staphylococcus aureus</i> d: <i>staphylococcus equorum</i>	a: 1.748, b: 1.855, c: 2.272, d: 1.987
	Οξυγαλακτικά	<i>Lactococcus lactis</i>	2.191, 2.234

4.5 ΟΞΥΓΑΛΑΚΤΙΚΑ

Τα οξύγαλακτικά που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν αφορούσαν τα ακόλουθα είδη: *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus malodoratus*, τα οποία έχουν σημαντικές ιδιότητες και χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά σε γαλακτοκομικά προϊόντα και θεραπευτικά παρασκευάσματα.

Στον πίνακα 4.19 παρουσιάζονται τα απομονωθέντα είδη με τις πιθανές βιολειτουργικές τους ιδιότητες.

Πίνακας 4.19 Γαλακτοβάκιλλοι, οι ιδιότητές τους και βιβλιογραφικές αναφορές

Γαλακτοβάκιλλοι	ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	Βιβλιογραφικές Αναφορές
<i>Lactococcus lactis</i>	Ζυμώνει τη λακτόζη σε γαλακτικό οξύ. Είναι πολύ σημαντικό στη παραγωγή βουτύρου και τυριού. Έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες. Είναι το πιο σημαντικό στη βιομηχανική ζύμωση και ειδικά για τη παραγωγή γαλακτοκομικών προϊόντων.	Aspri et al., 2016; Tamang et al., 2016; Wenjan et al., 2012
<i>Enterococcus faecium</i>	Παράγονται βακτηριοσίνες δρώντας ενάντια στη <i>Listeria monocytogenes</i> . Παραγωγή αντιμικροβιακών ουσιών.	Aspri et al., 2016; Carminatti et al., 2014
<i>Enterococcus faecalis</i>	Είναι από τα είδη με λιπολυτική ικανότητα, τα οποία προσδίδουν έντονη γεύση στα τυριά. Στο ονόγαλα είναι μειωμένη λόγω του χαμηλού ποσοστού σε λίπος. Επίσης παρουσιάζει αντιμικροβιακή δράση.	Aspri et al., 2016; Zervos et al., 2010
<i>Enterococcus malodoratus</i>	Αντιμικροβιακή δράση, παραγωγή τυριού	Zervos et al., 2010; Collins et al., 1984

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη αποτυπώθηκε το μικροβιακό προφίλ 70% του ονογάλακτος εκτροφών στην Ελλάδα και κατά συνέπεια η μελέτη θεωρείται αντιπροσωπευτική της υφιστάμενης κατάστασης. Κατά την ανάλυση του μικροβιολογικού προφίλ του ονογάλακτος διαπιστώσαμε ότι αυτό παρουσιάζει χαμηλό ποσοστό μικροοργανισμών. Όσον αφορά τα εντεροβακτηριακά και την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα στα δείγματά μας από όλες τις εκτροφές που συλλέξαμε, αυτό που παρατηρήσαμε από τα 14 δείγματα είναι ότι στα 3 δείγματα βρέθηκαν εντεροβακτηριακά (21%) χαμηλό ποσοστό, ενώ όσον αφορά την Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα ο αριθμός που βρέθηκε στα 8 από τα 14 δείγματα ήταν πολύ χαμηλός μόνο σε ένα δείγμα βρέθηκε *Escherichia coli*. Συγκεκριμένα στη παρούσα μελέτη η μέση τιμή των δειγμάτων στα Εντεροβακτηριακά ήταν 4,1cfu/ml, αποτέλεσμα που συμφωνεί και με άλλες βιβλιογραφικές πηγές (Papademas et al., 2016; Malissiova et al., 2015;), ενώ και η μέση τιμή στην Ολική Μεσόφιλη Χλωρίδα βρέθηκε 5,92 cfu/ml (Malissiova et al., 2015; Papademas et al., 2016;). Γεγονός που υποδεικνύει συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των μετρήσεων του μικροβιακού φορτίου, το οποίο είναι πάρα πολύ χαμηλό, ότι οι συνθήκες υγιεινής στις εκτροφές δεν είναι υποβαθμισμένες και ότι τηρούνται οι κανόνες υγιεινής. Ενδεχομένως οι διαφορές μεταξύ των εκτροφών να οφείλονται σε διαφορές στις συνθήκες υγιεινής του στάβλου, της αρμεγής, της συσκευασίας κλπ.

Σε σχέση με την ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που απομονώθηκαν διαπιστώθηκε ταύτιση των αποτελεσμάτων και με τις κλασσικές μεθόδους ταυτοποίησης και με την ταυτοποίηση με Maldi- Tof). Σε κάθε περίπτωση η τεχνική η Maldi – Tof υπερέχει, διότι η ταυτοποίηση των βακτηρίων γίνεται με μεγαλύτερη ταχύτητα, χαμηλότερο κόστος συνδυάζοντας και υψηλή αξιοπιστία, όπως άλλωστε αναφέρεται και από άλλους (Nikolaou et al., 2012).

Σε σχέση με τις μετρήσεις των οξυγαλακτικών στα δείγματα μας το αποτέλεσμα ήταν ικανοποιητικό. Σύμφωνα με την ταυτοποίηση των αποτελεσμάτων με τη τεχνική Maldi

– Τof τα οξυγαλακτικά όσον αφορά τη ποικιλομορφία, τα είδη που βρεθήκανε ήτανε *Lactococcus lactis* (55%, 12/22), *Enterococcus faecalis* (32%, 7/22), *Enterococcus faecium* (18%, 4/24), *Enterococcus malodoratus* (1%). Οι παρατηρήσεις μας είναι σύμφωνες και με άλλες μελέτες (Papademas et al., 2016; Murua et al., 2013; Carminatti et al., 2014). Το γένος *Enterococcus* περιλαμβάνει 46 είδη αλλά μόνο τα *E. faecalis* και *E. faecium* χρησιμοποιούνται ως προβιοτικά όπως και το *Lactococcus lactis* σε εφαρμογές γαλακτοκομικών προϊόντων καθώς και το *Enterococcus malodoratus* (Wenjun Liu et al., 2012). Η παρούσα μελέτη διαπιστώνει ότι το ονόγαλα είναι ένα μικροπεριβάλλον πλούσιο σε ποικίλα μικρόβια και ιδιαίτερα οξυγαλακτικά, κάτι που θα μπορούσε να θεωρηθεί ως πολύτιμη πηγή βακτηριακών στελεχών. Οι εντερόκοκκοι που διαπιστώθηκε ότι υπάρχουν θεωρούνται ασφαλείς και επιδεικνύουν ενδιαφέρουσες τεχνολογικές και πιθανώς βιολειτουργικές ιδιότητες που θα μπορούσαν να αξιοποιηθούν από τη βιομηχανία στους τομείς της μικροβιολογίας τροφίμων (ως προβιοτικά) και της τεχνολογίας γάλακτος (ως νέα ζυμούμενα προϊόντα).

Ως περιορισμός στη συγκεκριμένη μελέτη θα μπορούσε να θεωρηθεί ο σχετικά ο μικρός αριθμός δειγμάτων, που θα μπορούσε να διευρυνθεί με δειγματοληψία από όλες τις εκτροφές όνων στην Ελλάδα αλλά και με μεγαλύτερη διάρκεια δειγματοληψίας.

Ως μελλοντική έρευνα θα μπορούσαμε να πούμε ότι το κομμάτι των οξυγαλακτικών από το ονόγαλα ή η προσθήκη τους στο ονόγαλα είναι ένας τομέας με αρχόμενη ερευνητική δραστηριότητα αλλά προοπτική για την αξιοποίηση ενός πολύτιμου προϊόντος. Συμπερασματικά θα μπορούσαμε να διατυπώσουμε τα εξής:

- Το ονόγαλα στην Ελλάδα έχει πολύ χαμηλό μικροβιακό φορτίο και απουσία παθογόνων.
- Το ονόγαλα περιέχει ποικιλία οξυγαλακτικών με προοπτική αξιοποίησης είτε στη μικροβιολογία τροφίμων (ως προβιοτικά) είτε της τεχνολογίας γάλακτος (ως νέα ζυμούμενα προϊόντα).

Ξενογλώσσα

Agamy El, Ruppanner R, Ismail A, Champagne CP, Assaf R, (1992), Antibacterial and antiviral activity of camel milk protective proteins. J Dairy Res. 59(2):169-75

Alberghini L., Catellani P., Norbiato M.A., V. Giaccone (2013) MICROBIAL STATUS OF DONKEY'S MILK: FIRST RESULTS , Italian Journal of Food Safety vol. 3 pp.7-9

Amati L., Marzulli G., Martulli M., Tafaro A., Jirillo F., Pugliese V., Martemucci G., D' Alessandro A.G and Jirillo E., (2010), Donkey and Goat Milk Intake and Modulation of the Human Aged Immune Response. Current Pharmaceutical Design , 16, 000-000

Aspri Maria, Nicole Economou & Photis Papademas (2016) Donkey milk: An overview on functionality, technology and future prospects. Food Reviews International

Aspri Maria, Despina Bozoudi, Dimitris Tsaltas, Colin Hill, Photis Papademas (2016), Raw Donkey Milk as a source of *Enterococcus* diversity: Assessment of their technological properties and safety characteristics. ScienceDirect Food Control 1-10

Axelsson LT (1993) Lactic Acid Bacteria: Classification and physiology In: Lactic Acid Bacteria (Salminen S and von Wright A, Eds.), Marcel Dekker Inc., New York, USA, pp.1-64

Blasi F., D. Montesano, M. De Angelis, A. Maurizi, F. Ventura, L. Cossignani, M.S. Simonetti, P. Damiani (2008) Results of stereospecific analysis of triacylglycerol fraction from donkey, cow, ewe, goat and buffalo milk. Journal of food composition and analysis vol.21 no 1 p. 1-7

Bozoglu T. Faruk , Bibek Ray (1995) Lactic Acid Bacteria: Current Advances in Metabolism, Genetics and Application p.253-254

Carroccio A, Cavataio F, Iacono G (1999) Cross – reactivity between milk proteins of different animals. Clin. Exp. Allergy 29: 1014-16

Carminati D., Tidona F., Fornasari ME, Rossetti L, Meucci A, Giraffa G.(2014) Biotyping of cultivable lactic acid bacteria isolated from donkey milk. . Let. Appl. Microbiol.59 (3):299-305

Cavallarin Laura, Giribaldi Marzia, Maria de los Dolores Soto- Del Rio, Valle Emanuela, Barbarino Gandolfo, Gennero Maria Silvia , Cineria Tiziana (2015) A survey on the milk chemical and microbiological quality in dairy donkey farms located in NorthWestern Italy Food control vol.50 p.230-235

Chiavari Cristiana , Colovetti Fabio , Nanni Mauro, Sorrentino Elena, Grazia Luigi (2006) “HAL” Use of donkey’s milk for a fermented beverage with lactobacilli Journal of dairy science. Lait . 85: 481-490

Criscione Andrea, Vincenzo Cunsolo, Bordonaro Salvatore, Guastella Anna Maria, Saletti Rosaria, Zuccaro Antonio, D’Urso Giuseppe, Marletta Donata (2009) Donkeys’ milk protein fraction investigated by electrophoretic methods and mass spectrometric analysis. International Dairy Journal 19 190 - 197

Desalegn Amenu,(2015), Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria from Human Milk,Journal of Medical Microbiology & Diagnosis p.2

Diana Brumini, Andrea Criscione, Salvatore Bordonare, Gerd Elisabeth Vegarud, Donata Marletta, (2015), Whey proteins and their antimicrobial properties in donkey milk: a brief review. Dairy Science & Technology v.96, issue 1, pp1-14

Elina Tuomola, Ross Crittenden Martin Playne, Erika Isolauri, Seppo Salminen.(2001), Quality assurance criteria for probiotic bacteria, The American Journal of Clinical Nutrition, pp.393S

Elisabetta Salimei, Francesco FANTUZ, Raffaele COPPOLA, Biagina CHIOFALO, Paolo POLIDORI, Giorgio VARISO, (2004), Composition and characteristics of ass’s milk p. 68

Garrido- Olivia Cano, Franzoso – Joaquin Seras, and Fruitos – Elena Garcia (2015) Lactic acid Bacteria: reviewing the potential of a promising delivery live vector for biomedical purposes. MICROBIAL CELL FACTORIES 14:137

Gastaldi Daniela, Bertino Enrico, Monti Giovanna, Baro Cristina, Fabris Claudio, Lezo Antonela, Medana Claudio, Baiocchi Claudio, Mussap Michele, Galvano Fabio, Conti Amedeo, (2010), Donkey's milk detailed lipid composition. Frontiers in Bioscience E2, 537-546

Gubic M. Jasmina , Saric C. Ljubisa ,. Saric M. Bojana ,Mand I. Anamarija , Jovanov T. Pavle , Plavsic V. Dragana , Okanovic G. Dorde, (2014), Microbiological, Chemical and Sensory Properties of Domestic Donkey's Milk from Autochtones Serbian Breed pp.633

Guo H.Y. , Pang K. , Zhang X.Y. , Zhao L. , Chen S.W., Dong M.L. and Ren F.Z. (2007) Composition, Physiochemical Properties, Nitrogen Fraction Distribution and Amino Acid Profile of Donkey Milk. Regs. Journal Dairy Science 90:1635

Iakono G. , Carroccio A., Catavaio F., Montatto G., Soresi M. and Balsamo V. (1992). Use of Ass's Milk in Multiple Food Allergy. J. Pediatr.Gastroenterol.Nutr.14:p.177-181

Ivankovic Ante, Ramljak Jelena, Konjacic (2009) Characteristics of the lactation, chemical composition and milk hygiene quality of the Littoral- Dinaric ass. Mijekarstvo 59 (2)p.107-113

Jirillo F, Jirillo E, Magrone T, (2010), Donkey's and goat's milk consumption and benefits to human health with special reference to the inflammatory status. Current Pharmaceutical Design, 16(7) : 859-63

Jirillo F, Magrone T, (2014), Anti- inflammatory and anti- allergic properties of donkey's and goat's milk, “ Endocrine Metabolic Immune Disorders Targets” 14 (1): 27-37

Jyoti P. Tamang, Dong- Hwa Shin, Su-Jin Jung, Soo-Wan Chae,(2016), Functional Properties of Microorganisms in Fermented Foods, Front. Microbiology 7:578

Khalisanni Khalid.(2011), An overview of lactic acid bacteria, International Journal of Biosciences, pp 9

Knut J Heller (2001), Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. The American Journal of clinical Nutrition 73: 374S-9S.

Malissiova Eleni, Arsenos Georgios , Papademas Photis, Fletouris Dimitrios, Manouras(2015) Assessment of donkey milk chemical, microbiological and sensory attributes in Greece and Cyprus, , International Journal of Dairy Technology

Mansueto Pasquale, Iacono Giuseppe, Taormina Giuseppe, Seidita Aurelio, D' Alcamo Alberto, Adragna Floriana, Radnazzo Giusi, Carta Miriam, Rini Giovambattista, Carroccio Antonio, (2013), Ass's Milk In Allergy To Cow's Milk Protein : A Review. Acta Medica Mediterranea 29: 153

Marletta Donata, Tidona Flavio and Bordonaro Salvatore, (2016), Donkey Milk Proteins: Digestibility and Nutritional Significance . Chapter 10, Council for Research in Agriculture Economy Analysis (CREA)

Massimo Malacarne, Francesca Martuzzi, Andrea Summer, Primo Mariani , (2002), Protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cow's milk. International Dairy Journal 12, 869-877

Monti G, Bertino E, Muratore MC, Coscia A, Cresi F, Silvestro L, Fabris C, Fortunato D, Giuffrida MG, Conti A (2007) Efficacy of donkey's milk in treating highly problematic cow's milk allergic children: An in vivo and in vitro study. Pediatr. Allergy Immunol. 18: 258-64

Monti G, Viola S, Baro C, Cresi F, Tovo PA, Moro G, Ferrero MP, Conti A, Bertino E (2012) Tolerability of donkey's milk in 92 highly problematic – cow's milk allergic children. J. Biol. Regul. Homeost Agents. (Suppl.3): 75-82

Murua A, Todorov SD, Vieira AD, Martinez RC, Cencic A and B.D.G.M. Franco (2013) Isolation and identification of bacteriocinogenic strain of *Lactobacillus plantarum* with potential beneficial properties from donkey milk. The Society for Applied Microbiology

Nazzaro Filomena, Orlando Pierangelo, Fratianni Florida and Coppola Raffaele, (2010), Isolation of Components with Antimicrobial Property from the Donkey Milk: A Preliminary Study. The Open Food Science Journal, 4, p. 43-47

Nikolaou Nikoletta, Yun Xu, Royston Goudacre (2012), Detection and Quantification of Bacterial Spoilage in Milk and Pork Meat using MALDI-TOF-MS and multivariate analysis. Analytical Chemistry

Papademas P, Parmaxi I, Aspri M,(2015) Probiotic, Antimicrobial, Antioxidant and Sensory properties of Fermented donkey milk with *Lactobacillus fermented* ME-3 and *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356), BIOACCENT Microbiology

Perna A, Intaglietta I, Simonetti A, Gambacorta E (2015) Donkey Milk for Manufacture of Novel Functional Fermented Beverages. J Food Sci.80(6):S 1352-9

Mariani PL, (2010), Donkey milk nutraceutical characteristics: A biochemical evaluation of nutritious and clinical properties

Pilla R, Dapra V, Zeccori A, Piccinini R.(2010) Hygienic and health characteristics of donkey milk during a follow-up study. J Dairy Res.77(4):392-7

Polidori Paolo, Beghelli Daniela, Mariani Pierlu-igi , Vincenzetti Silvia (2009) Donkey Milk Production: State of the art. Italian Journal of Animal Science 4:678

Polidori Paolo and Silvia Vincenzetti, (2012), Protein Profile Characterization of Donkey Milk. INTECH

Paolo Polidori, Ambra Ariani and Silvia Vincenzetti (2015) Use of Donkey Milk in Cases of Cow's Milk Protein Allergies. International Journal of Child Health and Nutrition, 4, 174 - 179

Saarela M, Mogensen G., Fonden R, Matto J, Mattila-Sandholm T, (2000), Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties

Salimei E.(2011) Animals that Produce Dairy Foods / Donkey In Fuguery JW, Fox PF and McSweeney plh (eds), Encyclopedia of Dairy Sciences, Second Edition, vol.1 pp.365-373 San Diego: Academic Press p.369

Salimei S., Fantez F.(2011). Equid milk for human consumption. Encyclopedia of Dairy Sciences, 1:130

Sarno Eleonora, Santoro M.L. Adriano, Rossella Di Palo & Nicola Costanzo, (2016), Microbiological quality of raw donkey milk from Campania Region. Italian Journal of Animal Science, 11:3

Seachol Min, Linda J. Harris and John M. Krochta(2005) Antimicrobial Effects of Lactoferrin, Lysozyme and the Lactoperoxidase System and Edible Whey Protein Films Incorporating the Lactoperoxidase System Against Salmonella enteric and E. Coli 0157:H7, Journal of Food Science vol.70 p.332-338

Seppo Salminen, Atte von Wright, Arthur Ouwehand, Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects, Third Editio

Tannock GW (2004) A special fondness for Lactobacilli. Applied and Environmental Microbiology, 70, 3189 - 3194

Teshome Gemechu (2015), Review on lactic acid bacteria function in milk fermentation and preservation, African Journal of Food Science, vol.9(4), pp.170-175

Tesse Riccardina , Paglialunga Claudia , Braccio Serena and Armenio Lucio (2009) Adequacy and tolerance to ass's milk in an Italian cohort of children with cow's milk allergy. Italian Journal of pediatrics 35:19-22

Tidona Flavio, Camilla Sekse, Andrea Criscione, Morten Jacobsen, Salvatore Bordonaro, Donata Marletta, Gerd Elisabeth Vegarud, (2011), Antimicrobial effect os

donkeys' milk digested in vitro with human gastrointestinal enzymes. *International Dairy Journal* 21p.158-165

Uniacke- Lowe, Therese, (2011), Studies on equine milk and comparative studies on equine and bovine milk systems. PhD Thesis, University College Cork 1.1.4 p. 7-50

Vanderhoof, Jon A ; Young, Rosemary J., (1998), Use of probiotics in childhood Gastrointestinal disorders. *Journal of Pediatrics Gastroenterology & Nutrition* , volume 27, Issue 3, pp. 323-332

Vincenzetti Silvia, Amici Adolfo, Pucciarelli Stefania, Vita Alberto, Micozzi Daniela, Carpi M. Francesco, Polzonetti Valeria, Natalini Paolo and Polidori Paolo, (2012), A Proteomic Study on Donkey Milk, *Biochemistry & Analytical Biochemistry*. 1:2

Vincenzetti Silvia, Polidori Paolo, Pierluigi Mariani, Cammertoni Natalina, Fantuz Francesco, Vita Alberto, (2007), Donkey's milk protein fractions characterization, pp 640-641

Vincenzetti Silvia, Polidori Paolo and Vita Alberto, (2007), Nutritional Characteristics of Donkey's Milk Protein Fraction. *Dietary Protein Research Trends* pp.207-225

Virtanen T., Pihlanto A., Akkanen S., Korhonen H., (2006), Development of antioxidant activity in milk whey during fermentation with lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*.

Vita D, Passalacqua C, Di Pasquale G, Caminiti L, Crisafulli G, Rulli I, Pajno GB (2007) Ass's milk in children with atopic dermatitis and cow's milk allergy : crossover comparison with goat's milk. *Pediatric Allergy and Immunology* 18: 594-8

Wenjun Liu, Huili Pang, Zhang Heping, Yimin Cai (2012) *Biodiversity of Lactic Acid Bacteria*- Springer, Chapter 2

Xueying M., Junnan Gu, Yan Sun, Fazheng Ren, (2009), Anti- proliferative and anti-tumour effect of active components in donkey milk on A549 human lung cancer cells, International Dairy Journal, volume : 19, p.703-708

Zervos J Marcus, M.D., Joseph W Chow, M.D., Anne Chen, M.D., Muder R. Robert, M.D., (2010), Enterococcus species. Antimicrobe

Zhang Xiao- Ying, Zhao Liang , Jiang Lu (2008) The antimicrobial activity of donkey milk and microflora changes during storage, FOOD CONTROL ISSN 0956-7135 vol.19 pp.1191-1195[5 page(s) article]

Anonymous,2016 <http://www.Γαλακτοβάκιλλοι.gr>

Anonymous, 2016 <http://www.Donkey> milk, Wikipedia

Anonymous, 2016 <http://www.el.Γάϊδαρος>, Wikipedia

Anonymous, 2016 <http://www.Lactobacillales> Wikipedia